

Aus dem Pathologischen  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

**Die Bedeutung der potentiellen  
Tumorstammzellmarker CD29 und CD24 für die  
Progression kolorektaler Karzinome**

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Eva Michaela Winter, geb. Hartung**

aus

Hof

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Jung

Mitberichterstatter: PD Dr. Enrico De Toni  
Prof. Dr. Lars Lindner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2019

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
2.1. DAS KOLOREKTALE KARZINOM .....	2
2.1.1. <i>Epidemiologie</i> .....	2
2.1.2. <i>Klassifikation</i> .....	3
2.1.3. <i>Therapie und Prognose</i> .....	4
2.2. PATHOGENESE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS .....	5
2.2.1. <i>Histologische Ebene</i> .....	5
2.2.2. <i>Molekulare Ebene</i> .....	6
2.2.3. <i>Regulatorische Ebene</i> .....	7
2.2.4. <i>Das Cancer Stem Cell Modell</i> .....	10
2.3. THERAPEUTISCHE ANGRIFFSPUNKTE .....	12
2.3.1. <i>Therapieleitlinien</i> .....	12
2.3.1. <i>Angriff von Krebs-Stammzellen</i> .....	12
2.4. OBERFLÄCHENMARKER VON <i>CANCER STEM CELLS</i> .....	13
2.4.1. <i>Bisher untersuchte Cancer Stem Cell Marker beim kolorektalen Karzinom</i> .....	13
2.4.2. <i>Hypothese</i> .....	14
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
3.1. PATIENTENKOLLEKTIV .....	15
3.2. WESTERN BLOTTING .....	16
3.3. IMMUNHISTOCHEMIE .....	21
3.3.1. <i>Zelllinien</i> .....	21
3.3.2. <i>Gewebeproben</i> .....	22
3.3.3. <i>Kollektiv</i> .....	22
3.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	23
<b>IV. ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
4.1. ZUSAMMENSETZUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	24
4.2. ERGEBNISSE DER ANTIKÖRPER-TESTS .....	25
4.2.1. <i>Spezifischer Nachweis von CD29 durch Epitomics anti-CD29 clone EPR1040Y und von CD24 durch Santa Cruz anti-CD24 clone 3H1143</i> .....	25
4.2.2. <i>Spezifische immunhistochemische Expression der Antikörper in den überprüften Zelllinien</i> .....	27
4.2.3. <i>Expressionsmuster von CD29 und CD24 in Gewebeproben</i> .....	28
4.3. ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNG .....	29
4.3.1. <i>Scoring</i> .....	29
4.3.2. <i>Statistische Auswertung</i> .....	32



4.3.2.1.	Deskriptive Statistik .....	32
4.3.2.2.	Das Expressionsmuster von CD29 und CD24 korreliert teilweise mit dem Differenzierungsgrad .....	34
4.3.2.3.	Das Expressionsmuster von CD29 und CD24 korreliert teilweise signifikant mit dem tumorspezifischen Überleben .....	35
4.3.2.4.	Das Expressionsmuster von CD29 und CD24 korreliert teilweise signifikant mit der Progression kolorektaler Tumoren .....	39
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>53</b>
<b>VII.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>57</b>
<b>VIII.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>58</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>59</b>
	DANKSAGUNG .....	59
	EIDESSTÄTTICHE VERSICHERUNG .....	60

## I. Zusammenfassung

In Deutschland erkrankt einer von 14 Männern und eine von 18 Frauen im Laufe ihres Lebens an einem kolorektalen Karzinom. Obwohl es sich beim kolorektalen Karzinom um eine der am besten erforschten Tumorerkrankungen des Menschen handelt, beträgt die Stadien-unabhängige absolute 5-Jahres-Überlebensrate nur 52% und die absolute 10-Jahres-Überlebensrate lediglich 38 bzw. 40%. In späten Stadien versterben 92% aller Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnose. Den Hauptgrund für den tumorbedingten Tod stellen Therapieresistenzen und Progressionen in Form von Rezidiven und Metastasen dar. Um effektivere Therapien zu entwickeln, muss folglich das molekulare Verständnis der kolorektalen Karzinogenese erweitert werden.

Gemäß des *Cancer Stem Cell* Modells werden Tumoren und deren Metastasen von einer kleinen Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften initiiert und aufrechterhalten. Die Identifizierung dieser kolorektalen Krebs-Stammzellen bietet in diesem Zusammenhang gleichzeitig die Möglichkeit, Risikopatienten zu identifizieren und tumorbildende Zellen gezielt therapeutisch anzugreifen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu überprüfen, ob die zuvor als potentielle Krebs-Stammzellmarker beschriebenen Marker CD29 und CD24 geeignete Marker darstellen, um Tumorstammzellen in situ nachzuweisen. Hierzu wurde retrospektiv die immunhistochemische Expression von CD29 und CD24 an einem Kollektiv humaner kolorektaler Karzinome untersucht und anhand eines aufgrund des Färbemusters entwickelten semiquantitativen Scores ausgewertet. Als Basis diente ein Kollektiv von 156 kolorektalen Primärtumoren des Stadiums UICC II. Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden anschließend mit den entsprechenden klinischen Daten korreliert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD29 und CD24 Krebs-Stammzellmarker darstellen und deren vermehrte Expression folglich mit einer verkürzten Überlebenszeit beziehungsweise einer kürzeren Zeitspanne bis zum Auftreten einer Progression einhergeht.

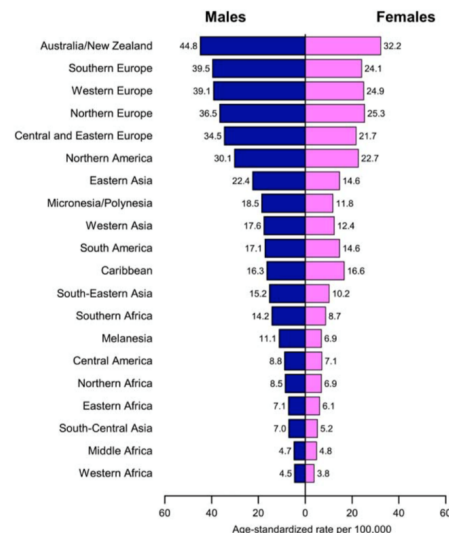
Diese Hypothese musste auf der Basis der Ergebnisse verworfen werden. Im Gegenteil wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen fehlender CD29- und CD24 Expression und tumorspezifischen Überleben beziehungsweise Progression kolorektaler Tumoren gezeigt. Patienten, deren Karzinome weder CD29 noch CD24 exprimieren, scheinen daher eine Risikogruppe für verstärkte Progressionen darzustellen. Dieser Zusammenhang muss in Studien mit größeren Kollektiven überprüft werden. Außerdem wird deutlich, dass die Funktion der beiden untersuchten Marker noch nicht ausreichend verstanden und der funktionale Effekt der Expression von Tumor-Stammzellmarkern bis dato unbekannt ist. Ein besseres funktionelles Verständnis wird langfristig den Weg zu gezielteren therapeutischen Angriffspunkten von Krebs-Stammzellen ebnen können.

## **II. Einleitung**

### **2.1. Das kolorektale Karzinom**

#### **2.1.1. Epidemiologie**

Krebs stellt zu Beginn des 21. Jahrhunderts immer noch eine der Haupttodesursachen von Menschen in der sogenannten westlichen Welt dar. 14,1 Millionen Personen erkrankten im Jahr 2012 weltweit neu an Krebs. Es wurden 8,2 Millionen krebsbedingte Todesfälle registriert [1]. Allein in Europa erkrankten 3,4 Millionen Männer und Frauen an Krebs, wovon 1,7 Millionen aufgrund der Erkrankung verstarben. Geschlechtsübergreifend stellt Dickdarmkrebs (kolorektales Karzinom, KRK) hierbei mit 446.800 Neuerkrankungen die am zweithäufigsten diagnostizierte maligne Tumorerkrankung und mit 214.700 Todesfällen die zweithäufigste zum Tod führende Krebsart dar [2]. In Deutschland erkrankt einer von 14 Männern (7,1%) und eine von 18 (5,5%) Frauen im Laufe ihres Lebens an Dickdarmkrebs, was diesen bei Männern zur dritthäufigsten und bei Frauen zur zweithäufigsten diagnostizierten Krebsart werden lässt. Obwohl es sich beim KRK um eine der am besten erforschten Tumorerkrankungen des Menschen handelt und bei frühzeitiger Diagnose und Therapie ein günstiger Krankheitsverlauf besteht, verstarben 2012 13.772 in Deutschland Männer bzw. 12.200 Frauen aufgrund dieser Erkrankung [3]. Neben genetischen und endogenen Prädispositionsfaktoren ist Dickdarmkrebs vor allem eine „Lifestyle“-Erkrankung, die vermehrt in Ländern mit hohem Entwicklungsindex auftritt (Abb. 1). Bewegungsmangel, Übergewicht, Alkoholkonsum sowie der Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch stehen im Verdacht, entzündliche Darmerkrankungen zu provozieren und somit die Entstehung von Dickdarmkrebs zu begünstigen [4, 5], wobei das Erkrankungsrisiko mit zunehmendem Lebensalter stetig ansteigt. Dieser weit verbreitete Lebensstil (Western-style) verbunden mit der demografischen Entwicklung in Deutschland und Europa wird folglich zu einem Anstieg der jährlichen Neuerkrankungen führen.



**Abb. 1:** Weltweite Verteilung von Neuerkrankungen an kolorektalen Karzinomen bei Frauen und Männern [1]. Die Erkrankung tritt hauptsächlich in Ländern mit hohem Entwicklungsstand und vermehrt bei Männern auf.

### 2.1.2. Klassifikation

Die Überlebensprognose sowie aktuelle Therapiemethoden orientieren sich derzeit hauptsächlich am Stadium des Tumors. Dieses wird gemäß der UICC (unio internationalis contra cancrum) anhand der sogenannten TNM-Klassifikation bestimmt, in der die anatomische Ausbreitung maligner Tumoren anhand dreier Komponenten beurteilt wird (Tab. 1):

- ❶ T (Tumor) bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors: T1-T4,
- ❷ N (Node) das Fehlen oder Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen: N0-N2 und
- ❸ M (Metastasis) das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen: M0-M1

Zusätzlich zur klinischen Klassifikation erfolgt postoperativ die histopathologische Klassifikation, wofür der Buchstabe „p“ vor der jeweiligen Kategorie eingefügt wird. Die TNM-Klassifikation hat internationale Gültigkeit und wird in regelmäßigen Abständen aktualisiert. Das jeweilige Stadium des Tumors zusammen mit molekularpathologischen Parametern bestimmen maßgeblich die zur Anwendung kommende Therapieform.

			UICC Stadium													
			0	I	II	IIA	IIB	IIC	III	IIIA	IIIB	IIC	IVA	IVB		
T	Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden														
	T0	kein Primärtumor nachweisbar														
	Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial bzw. Infiltration der Lamina propria														
	T1	Tumor infiltriert Submukosa														
	T2	Tumor infiltriert Muscularis propria														
	T3	Tumor infiltriert Subserosa oder in nicht-peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe														
	T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen														
	T4a	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum														
N	T4b	Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen														
	Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden														
	N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden														
	N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten														
	N1a	Metastasen in 1 regionären Lymphknoten														
	N1b	Metastasen in 2 oder 3 regionären Lymphknoten														
	N1c	Tumorknötchen, z.B. Satelliten, in Subserosa oder in nicht-peritonealisiertem perikolischem oder perirektalem Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen														
	N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten														
M	N2a	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten														
	N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten														
	M0	keine Fernmetastasen vorhanden														
	M1	Fernmetastasen vorhanden														
	M1a	Fernmetastasen auf ein Organ beschränkt														
	M1b	Fernmetastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum														

**Tab. 1:** TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms sowie entsprechende UICC Stadien gemäß WHO [6]

### 2.1.3. Therapie und Prognose

Im Gegensatz zu steigenden Inzidenzraten sinkt die Mortalitätsrate stetig. In Deutschland sind die altersstandardisierten Sterberaten in den letzten 10 Jahren bei beiden Geschlechtern um mehr als 20% gesunken [3]. Dies ist vor allem optimierten Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung sowie daraus resultierend frühzeitigen Therapiemaßnahmen geschuldet. Die optimale Therapie stellt hierbei immer eine vollständige Resektion des Primärtumors sowie der regionären Lymphknoten dar. Abhängig vom Stadium des Tumors und molekularen prädiktiven Biomarkern wird weiterhin über eine adjuvante Therapie entschieden. Diese besteht neben Radio- und/oder Chemotherapie im Rahmen des Konzeptes einer zielgerichteten Therapie unter anderem aus dem Einsatz monoklonaler Antikörper. Hierbei nehmen vor allem die anti-EGFR (Epidermal Growth Factor) zielgerichteten Antikörper Cetuximab und Panitumumab eine bedeutende Rolle ein, denn sie blockieren gezielt und damit spezifisch die EGFR-Signalkaskade, die in epithelialen Geweben Vorgänge wie Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese und Apoptose reguliert. Beim metastasierten kolorektalen Karzinom kann eine EGFR-Expression bei etwa 70% der Tumoren nachgewiesen werden und ist mit einer schlechten Prognose verbunden [7], was die Bedeutung der anti-EGFR zielgerichteten Therapie unterstreicht.

Patienten mit Tumoren des Stadiums III erhalten nach aktuellen Leitlinien immer eine adjuvante Therapie. Bei Tumoren des Stadiums II wird diese kontrovers diskutiert. So können beispielsweise innerhalb des Stadiums II Risikogruppen definiert werden, die von einer adjuvanten Therapie profitieren könnten [8]. Auch die Analyse von

Biomarkern ermöglicht eine Unterteilung in Hoch- und Niedrig-Risikogruppen innerhalb des Stadiums II. Weiterhin zeigt eine anti-EGFR Therapie nur bei Tumoren Wirksamkeit, bei denen unabhängig vom Stadium des Tumors, ein KRAS-Wildtyp erwartet werden kann, wohingegen deren Nutzen bei Vorliegen einer KRAS-Mutation fraglich ist und das Risiko von Nebenwirkungen und unnötigen Kosten birgt [7].

Das Stadium des Tumors zum Diagnosezeitpunkt hängt eng mit der Prognose zusammen. Während Patienten mit einem KRK des Stadiums I und II eine 5-Jahres-Überlebensrate von 93% bzw. 84 - 72% aufweisen, liegt diese bei Patienten mit einem Stadium III zwischen 83 und 44%. Bei Tumoren des Stadiums IV beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur 8% [9], was bedeutet, dass 92% aller Patienten mit einem Stadium IV Tumor innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnose aufgrund ihres Tumorleidens versterben. Ursächlich für diese äußerst schlechte Prognose sind die im Stadium IV immer vorhandenen Fernmetastasen. Ebenso kommen Chemoresistenzen der Tumorzellen gegenüber adjuvanten Therapien in Betracht, die nach vorübergehender Therapie-induzierter Remission des Tumors zu Rezidiven führen.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines KRKs liegen bei 18-25% der Patienten bereits Fernmetastasen vor. Unabhängig vom Tumorstadium besteht auch nach kurativer Therapie für 5 Jahre ein erhöhtes Risiko für lokale oder lokoregionäre Rezidive (3 – 24%) und Fernmetastasen (25%), wobei das Risiko bei fortgeschrittenen Stadien höher ist [10]. Patienten, die sich mit einer schlechten Überlebensprognose konfrontiert sehen, bilden also eine große Gruppe innerhalb der an Dickdarmkrebs Erkrankten. Weiterhin fällt auf, dass Patienten mit einem frühen Stadium III eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate aufweisen als Patienten mit einem späten Stadium II Tumor, was ein Hinweis darauf ist, dass das TNM-Stadium allein nicht ausreicht, um die Therapie gezielt auswählen und eine Prognose zuverlässig aussprechen zu können. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, das molekulare Verständnis der Erkrankung zu erweitern um daraus bessere Behandlungsstrategien entwickeln zu können.

## **2.2. Pathogenese des kolorektalen Karzinoms**

### **2.2.1. Histologische Ebene**

Im gesamten Dickdarm kleidet eine Schicht von Epithelzellen tubuläre Drüsen, den Krypten aus, wodurch die effektive Oberfläche des Kolons und Rektums vergrößert wird. Eine kleine Anzahl an der Basis jeder Krypte lokalisierter Stammzellen bildet nach asymmetrischer Teilung und Transdifferenzierung vier Zelltypen aus: resorptive Saumzellen, schleimbildende Becherzellen, neuroepitheliale Zellen und Zellen der transienten Proliferationszone. Stammzellen und Zellen der transienten

Proliferationszone finden sich im unteren Drittel der Krypte, wohingegen die differenzierten Zelltypen im oberen Drittel zu finden sind. Die Zellen migrieren kontinuierlich zum oberen Kryptenende, um nach 3-6 Tagen durch einen Apoptose-Mechanismus ins Darmlumen exfoliert zu werden. Dabei herrscht ein Gleichgewicht, indem die Zellmitoseraten den Zellverlusten entsprechen. Tumoren resultieren aus dem Verlust des Gleichgewichtes von Zellneubildung und Zellverlust mit einem Überwiegen der Zellneubildung bei meist gleichzeitiger Reduktion der Apoptose.

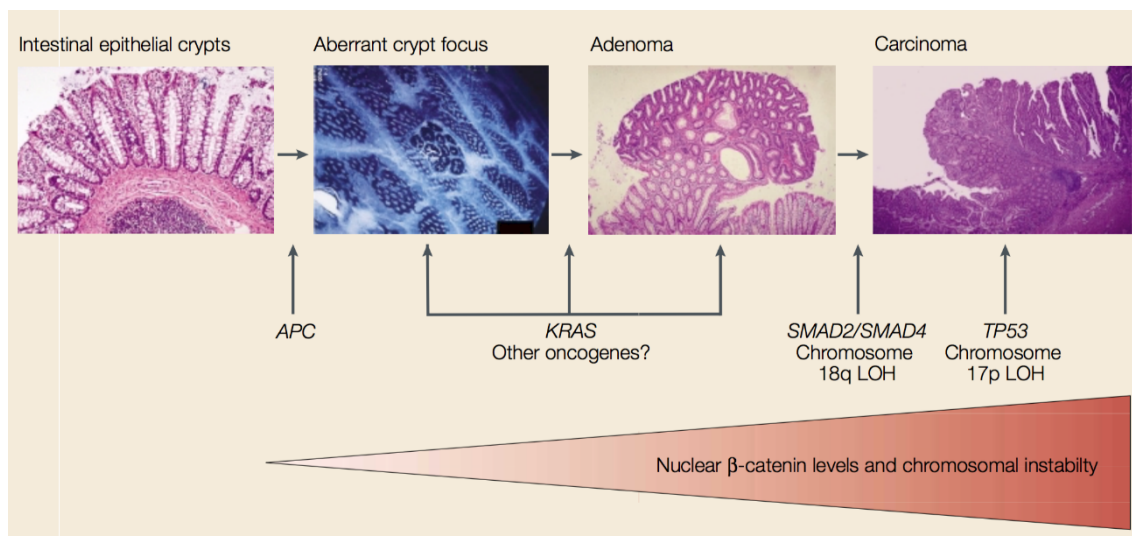
Kolorektale Karzinome entwickeln sich in mehreren Schritten über mehrere Jahre bis Jahrzehnte hinweg aus benignen Vorläuferläsionen. Die früheste Manifestation kolorektaler Neoplasien stellen aberrante Kryptenfoci (ACF, *aberrant crypt foci*) dar. Diese können sich zu Polypen weiterentwickeln. Polypen stellen benigne Tumoren dar, welche protrudierend in das Darmlumen wachsen. Es kann zwischen hyperplastischen Polypen, die eine normale Zellmorphologie und Architektur aufweisen, und adenomatösen Polypen unterschieden werden. Adenomatöse Polypen sind durch abnormale inter- und intrazelluläre Organisation gekennzeichnet und repräsentieren ein prämalignes Stadium KRK [11]. Dieser Prozess der Entwicklung eines metastasierenden Karzinoms aus frühesten benignen kolorektalen Neoplasien deckt eine durchschnittliche Zeitspanne von 10 – 15 Jahren bis hin zu mehreren Jahrzehnten ab und wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet [12].

### 2.2.2. Molekulare Ebene

Nach dem *Multistep Carcinogenesis* Modells, das durch Bert Vogelsteins Arbeitsgruppe entwickelt wurde, resultieren die histopathologischen Veränderungen während der Adenom-Karzinom-Sequenz aus einer schrittweisen Akkumulation von (tumor-) genetischen Alterationen, die zu einer Aktivierung von Onkogenen (*gain of function*) sowie Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen (*loss of function*) führen. Vogelstein teilte den jeweiligen Entwicklungsstufen während der Adenom-Karzinom-Sequenz definierte Mutationen zu, die häufig in der jeweiligen Läsion nachzuweisen waren (Abb. 2). Entscheidend ist hierbei nicht die Reihenfolge der Mutationen, sondern die Gesamttakkumulation von Alterationen [13]. So finden sich in der Entwicklung eines KRKs typischerweise Mutationen in mindestens vier Genen. Regelmäßig betroffen sind das Onkogen KRAS (Kirsten rat sarcoma) sowie die drei Tumorsuppressor-Gene APC (adenomatous polyposis coli), SMAD4 (mother against decapentaplegic) und TP53 (tumorsuppressor protein 53 kdal) [11].

Die häufigsten genetischen Alterationen, die während der kolorektalen Tumorgenese auftreten, sind somatische Mutationen auf Chromosom 5q im APC-Gen, wodurch seine Tumorsuppressor-Funktion deaktiviert wird. In der Folge kommt es zur Aktivierung des

Wnt (wingless/ int [initiation of tumor growth])-Signalwegs, den APC kontrolliert. Da APC den Eintritt in die kolorektale Karzinogenese reguliert, wird es als *gatekeeper* der kolorektalen Karzinogenese bezeichnet [14]. So initiieren Mutationen im APC-Gen die Tumorgenese, was zur Entwicklung von ACF und Adenomen führt [15]. Konsekutive Mutationen treten im KRAS-Onkogen auf, was zu weiterem klonalem Wachstum und Expansion der Zellanzahl durch Verstärkung des Wnt-Signalwegs führt. Im weiteren Verlauf kommt es zu unter anderem zu Mutationen der Gene SMAD4, TP53 oder auch PIK3CA (phosphatidyl-inositol-3 kinase catalytic subunit alpha) was letzten Endes in die Entstehung eines metastasierenden Karzinoms mündet [16].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz nach dem Multistep Carcinogenesis Modell. Eine Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens APC führt zu frühesten Manifestationen kolorektaler Neoplasien, wohingegen genetische Alterationen auf Chromosom 17p in fortgeschrittenen Stadien zur funktionellen Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens und Transkriptionsfaktors TP53 und vermutlich zum Übergang in ein Karzinom führen. [11]

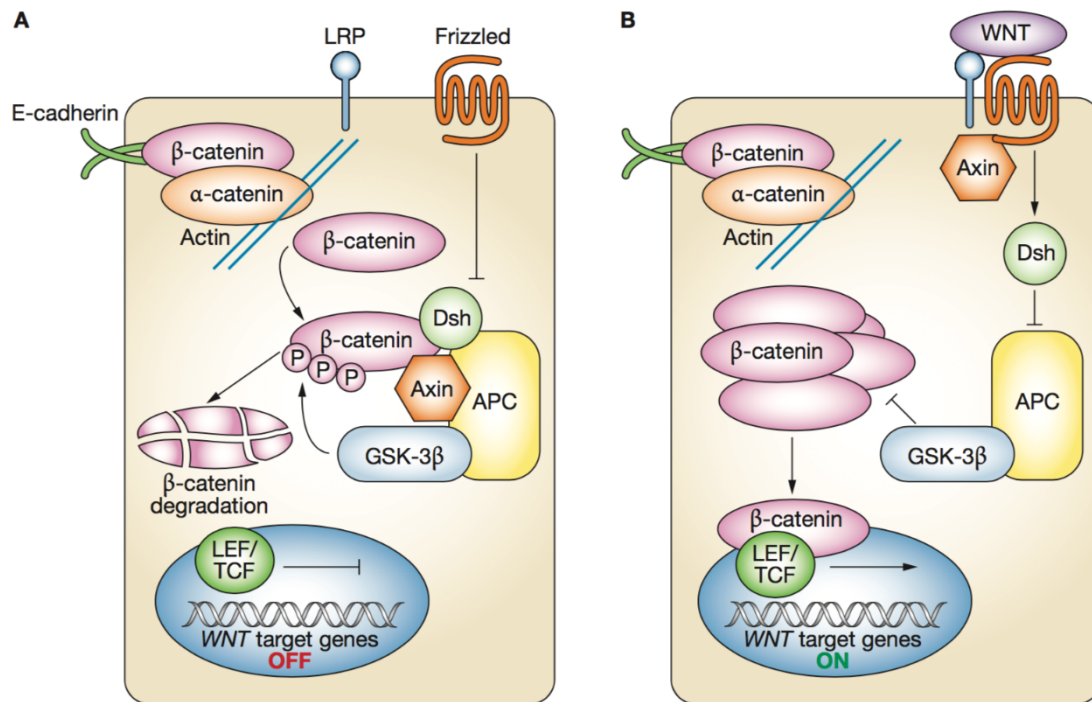
### 2.2.3. Regulatorische Ebene

Die tumorgenetischen Mutationen der betroffenen Gene führen auf regulatorischer Ebene zu einer Reihe weitreichender Veränderungen. Aufgrund seiner zentralen und initialen Rolle als *gatekeeper* in der kolorektalen Karzinogenese soll im Folgenden besonders auf die Konsequenzen des Funktionsverlusts des APC-Tumorsuppressor-Gens eingegangen werden.

APC kodiert für ein Protein, dessen essentielle Funktion in der Regulation des kanonischen WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs liegt. Dieser nimmt während der frühen Embryogenese in der Gastrulation, in der Homöostase der Gewebe, sowie auch in der Tumorentwicklung eine zentrale Rolle ein. Das durch den WNT-Signalweg regulierte  $\beta$ -Catenin nimmt eine ambivalente Rolle ein. Im Kontext mit E-Cadherin stabilisiert es



den epithelialen Phänotyp. Weiterhin interagiert  $\beta$ -Catenin mit DNA-bindenden Faktoren aus der LEF1 (lymphocyte enhancing factor)/TCF (T-cell factor) Familie. In diesem Kontext induziert  $\beta$ -Catenin einen mesenchymalen Phänotyp mit Eigenschaften von Tumorstammzellen. Beim Menschen sind mindestens 19 verschiedene Moleküle der WNT-Familie und mindestens 10 Mitglieder der WNT-Rezeptor-Familie FZ (*frizzled*) bekannt [17]. In Abwesenheit von WNT wird zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin, das seine Interaktion mit E-Cadherin verloren hat, dem „Degradationskomplex“ zugeführt, der sich mindestens aus den Komponenten APC, Glykogensynthasekinase-3- $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) und Axin zusammensetzt. Dies führt zur Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, wodurch es durch eine E3 Ubiquitin Ligase (TrCP) erkannt und abgebaut wird. Die Anwesenheit von WNT und dessen Bindung an seinen Rezeptor inhibiert den Degradationskomplex und führt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und dann auch im Zellkern, wo es schließlich die Expression von WNT-Zielgenen aktiviert [17] [18] (Abb. 3). Liegt nun wie bei 85% aller KRKs [14] eine Mutation des APC-Gens vor, kann APC seine Funktion im Degradationskomplex nicht erfüllen und es kommt zur Störung des Abbauprozesses von  $\beta$ -Catenin, das sich folglich akkumuliert und eine konstante Aktivierung des WNT-Signalweges nach sich zieht. Akkumuliertes  $\beta$ -Catenin führt dadurch zu unkontrollierter transkriptioneller Aktivierung von LEF1/ TCF Zielgenen, was für die Tumorgenese entscheidend ist [19]. Das Resultat der Aktivierung dieser Zielgene sind akquirierte Zelleigenschaften, die typischerweise kennzeichnend für maligne Krebserkrankungen sind und als *hallmarks of cancer* bezeichnet werden: Resistenz gegenüber Apoptose, eigenständige Aufrechterhaltung proliferativer Signale, Resistenz gegenüber anti-proliferativer Signale, Invasion und Metastasierung, unlimitierte Replikationsfähigkeit und Aufrechterhaltung der Tumorangiogenese [20]. Somit liegt die Schlüsselfunktion des Tumorsuppressor-Proteins APC in seiner Fähigkeit, freies  $\beta$ -Catenin zu destabilisieren und so die unkontrollierte Ausprägung der *hallmarks of cancer* zu vermeiden [21].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der WNT/β-Catenin Signalkaskade bei **A** Abwesenheit von WNT und **B** Bindung von WNT an FZ. Details siehe Text. Abbildung übernommen aus [18]

Die Bedeutung von β-Catenin in der Tumorgenese des KKR wird weiterhin dadurch untermauert, dass sich in Tumoren mit wildtypischem (WT) APC-Gen Mutationen des β-Catenin kodierenden CTNNB1-Gens finden, die es für den Abbau durch den Degradationskomplex unangreifbar machen [22], sodass auch in diesen Fällen der WNT-Signalweg konstitutiv aktiviert bleibt. Die Akkumulation von β-Catenin im Zellkern ist ein Indikator für einen aktivierten kanonischen WNT-Signalweg [23].

Der kanonische WNT-Signalweg nimmt bei der Aufrechterhaltung der normalen Homöostase von intestinalen Zellverbänden, insbesondere bei der Kontrolle der Funktion intestinaler epithelialer Stammzellen und bei der Aufrechterhaltung der Krypten-Architektur, eine zentrale Rolle ein. Es gibt Hinweise, dass die WNT Signalkaskade den dominantesten Faktor zur Kontrolle des Zellschicksals entlang der Achse Krypte – Villi von der Stammzelle über die Proliferation und Differenzierung bis hin zur Apoptose und Exfoliation ins Darmlumen darstellt [17] sowie die Selbsterneuerung von Stammzellen reguliert [24]. Ist der normale Ablauf des WNT-Signalwegs gestört, fehlt diese Kontrolle und die Zellen des Darmepithels können unkontrolliert proliferieren.

Translatiert man diese Erkenntnisse auf das *Multistep Carcinogenesis* Modell und vergleicht es mit der Histomorphologie humaner KKR, so stößt man auf einen Widerspruch. Obwohl tumorigene Mutationen den WNT-Signalweg bereits zu einem

frühen Zeitpunkt der kolorektalen Karzinogenese treffen und somit praktisch alle Tumorzellen diese Mutation aufweisen (truncal mutation), sollten folglich alle Tumorzellen nukleäres  $\beta$ -Catenin aufweisen. Jedoch findet sich histologisch eine heterogene intrazelluläre Verteilung von  $\beta$ -Catenin sowohl in Primärtumoren als auch Metastasen. Tumorzellen der Invasionsfront sowie in angrenzendes Stroma infiltrierende Zellen weisen nukleäres  $\beta$ -Catenin auf, während Tumorzellen zentraler Tumorareale durch membranöse exprimiertes  $\beta$ -Catenin charakterisiert sind. Dieses Phänomen wird als  $\beta$ -Catenin-Paradox bezeichnet und zeigt, dass KRK nicht deterministisch durch tumorgenetische Mutationen getrieben werden, sondern, dass sie immer noch reguliert werden können. Die nukleär  $\beta$ -Catenin positiven Tumorzellen scheinen eine besondere Rolle einzunehmen. Sie zeigen Eigenschaften von Tumorstammzellen und scheinen daher sowohl für die Tumorprogression als auch Bildung von Metastasen verantwortlich zu sein [25]. Hingegen zeigen Tumorzellen im Tumorzentrum mit nukleärem  $\beta$ -Catenin eine epitheliale Differenzierung [26], die mit einem geringeren tumorbildenden Potential einhergeht [27].

Des Weiteren stellt sich die Frage, wie Zellen mit einer nur geringen Lebensdauer, wie im Kolonepithel, während ihrer Lebensdauer ausreichend viele Mutationen anhäufen können, um maligne zu werden.

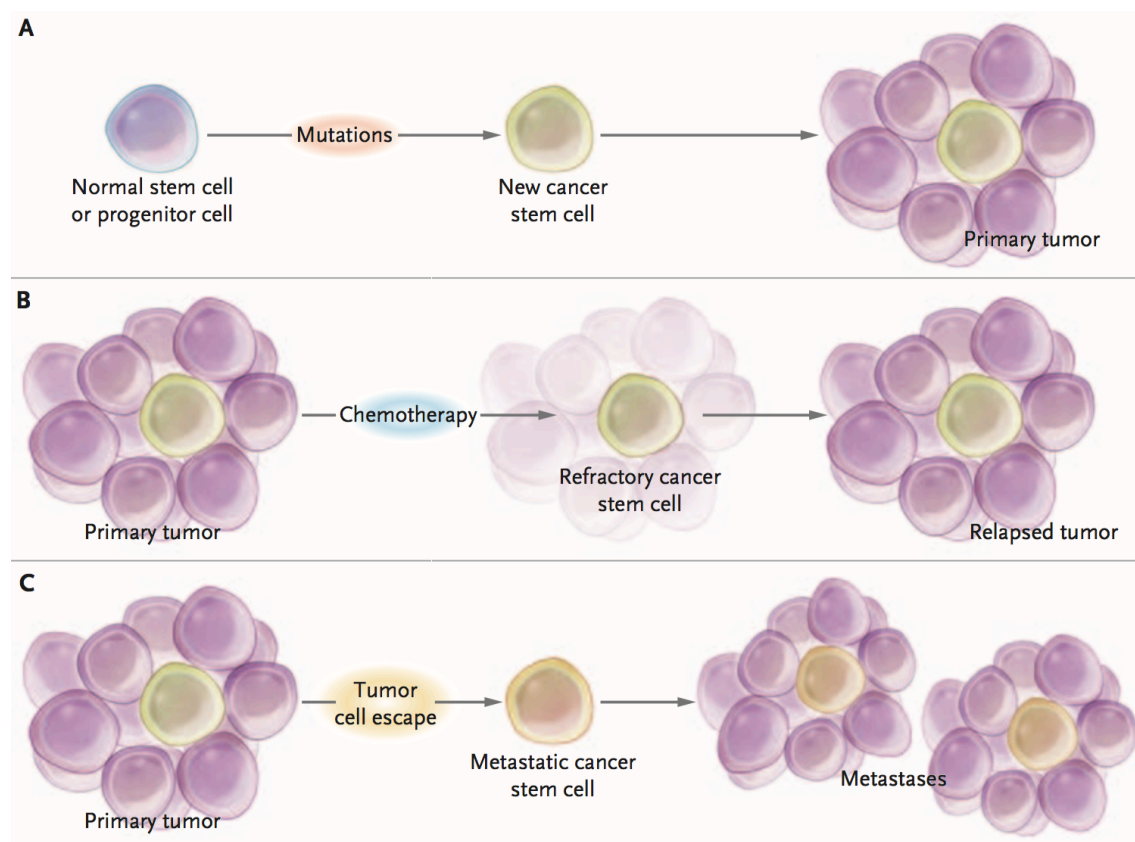
#### **2.2.4. Das *Cancer Stem Cell* Modell**

Diese bei vielen Tumoren beobachtete Heterogenität wird durch das *Cancer Stem Cell* (CSC) Modell erklärt. Tumoren sind komplexe dreidimensionale Strukturen, mit regulierbaren und dadurch heterogenen Tumorzellen. Dabei können Tumorzellen beeinflusst durch das Stroma dedifferenzieren oder differenzieren, sodass sich heterogene Strukturen entwickeln. Tumoren verhalten sich somit wie ihre korrespondierenden Normalgewebe, wobei Tumoren keine geordnete und gerichtete Organisation besitzen. An der Spitze des zellulären Spektrums stehen undifferenzierte Stammzellen bzw. in den Tumoren Krebs-Stammzellen (CSC, *Cancer Stem Cells*) [28].

Die Eigenschaften normaler Stammzellen wie die Fähigkeit zur Differenzierung, zur Selbsterneuerung und zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Differenzierung und Selbsterneuerung sowie insbesondere die Tatsache, dass sie die einzigen langlebigen Zellen in den meisten Wechselgeweben darstellen, prädisponieren sie als das Ziel für die Akkumulation multipler genetischer Alterationen über Jahrzehnte. Dieser Zusammenhang konnte für das intestinale Kompartiment experimentell gezeigt werden [29]. Mit der Terminologie CSC werden Tumorzellen bezeichnet, die Tumoren

initiiieren und heterogene Tumorzellen bzw. Tumoren hervorbringen können, die ihrem Ursprungstumor gleichen [28]. Der Nachweis von CSC gelang erstmals in Studien zur akuten myeloischen Leukämie, als entdeckt wurde, dass nur ein kleiner Anteil von zuvor entnommenen Leukämie-Zellen in der Lage war, die Erkrankung in immundefizienten Mäusen wieder hervorzurufen (Goldstandardexperiment)[30, 31]. Auch bei Studien zu kolorektalen Karzinomen konnte die Existenz von CSC nachgewiesen werden [32, 33].

Das CSC Modell basiert auf einer hierarchischen Organisation der Tumorzellen, wobei die wenigen CSC wegen Ihrer Kapazität zur Selbsterneuerung und Differenzierung als Ursache für das Wiederauftreten von Tumoren nach initialer Remission (relapse) nach erfolgter Chemotherapie (Resistenz) gesehen werden. Weiterhin werden CSC für die Ausbildung von Fernmetastasen verantwortlich gemacht [26, 34]. Denn in CSC sind Transport- und DNA-Reparaturmechanismen aktiv, die sie für Chemo- und Radiotherapien unempfindlich(er) werden lassen [35]. Aus diesen Zusammenhängen wird die Bedeutung der Identifizierung von CSC deutlich, denn nur, wenn diese therapeutisch angegriffen und eliminiert werden können, ist von einem dauerhaften Therapieerfolg auszugehen (Abb. 4).



**Abb. 4:** Rolle und Bedeutung der CSC-Zellen für Chemoresistenz und Metastasierung: **A** Die Mutation einer normalen Stamm- oder Progenitorzelle führt zur Entstehung einer Tumor-

Stammzelle (CSC), die zur Bildung des Primärtumors führt. **B** Wird die Tumor-Stammzelle durch Chemo- oder Radiotherapie nicht zerstört, obwohl die Mehrheit der die Tumormasse bildenden Tumorzellen getötet werden, kann dies zu einem Tumorrezidiv führen. **C** Tumorstammzellen des Primärtumors können migrieren, invadieren, intra- und extravasieren und Metastasen mit einer dem Primärtumor ähnlicher Architektur ausbilden [34].

## 2.3. Therapeutische Angriffspunkte

### 2.3.1. Therapieleitlinien

Die primäre Therapie eines kolorektalen Karzinoms stellt Stadien-unabhängig immer eine vollständige operative Entfernung des Primärtumors verbunden mit einer ausgedehnten Lymphadenektomie dar. Die weitere Therapie wird abhängig vom pathologischen Stadium festgelegt. Patienten des UICC-Stadiums III und IV erhalten nach operativer Entfernung des Tumors eine adjuvante Chemotherapie, wobei diese für Patienten des Stadiums II nur in ausgewählten Risikosituationen erwogen wird [10]. Trotzdem beträgt die Stadien-unabhängige absolute 5-Jahres-Überlebensrate bei deutschen Männern und Frauen lediglich 52%, die absolute 10-Jahres-Überlebensrate sogar nur 38 bzw. 40% [3]. Dies verdeutlicht, dass die aktuellen Therapiemaßnahmen bisher noch nicht gezielt auf die Tumor-verursachenden Mechanismen gelenkt werden konnten, was zum einen darin begründet liegt, dass die zugrunde liegenden molekularen Ursachen und Mechanismen der Pathogenese noch nicht vollständig verstanden sind, und zum anderen, dass die Tumor-verursachenden Zellen nicht angegriffen werden.

### 2.3.1. Angriff von Krebs-Stammzellen

Die weithin akzeptierte Annahme, dass die Tumorgenese von einigen wenigen Krebs-Stammzellen (cancer stem cells, CSC) angetrieben wird, verdeutlicht die Notwendigkeit, diese Zellen charakterisieren und identifizieren zu können. Es wird angenommen, dass CSC ähnlich wie normale Stammzellen über einen langsamen und teilweise ruhenden Zellzyklus verfügen, der sie unangreifbar gegenüber den eingesetzten Therapeutika macht, und somit auch noch Jahre nach primär erfolgreicher Therapie Rezidive und Metastasen verursachen können. Gelingt es nicht, diese Zellen zu eliminieren, kann demnach keine Heilung der Krebserkrankung oder zumindest ein langfristiger Profit von der Chemotherapie herbeigeführt werden.

Ein aktivierter kanonischer WNT ( $\beta$ -Catenin)-Signalweg stellt das Kennzeichen von im Kolon lokalisierten CSC dar [27]. Immunhistochemisch können CSC in Gewebeschnitten kolorektaler Karzinome durch nukleär lokalisiertes  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden

[36], jedoch fehlt weiterhin eine gezielte äußere Angriffsmöglichkeit dieser Zellen. Ein direkter Angriff von  $\beta$ -Catenin ist bisher nicht möglich, ❶ da seine Funktion nicht ausschließlich auf den WNT-Signalweg beschränkt ist, sondern es sich auch um ein integrales Strukturprotein der zonula adhaerens handelt, so dass mit einer solchen Therapie alle epithelialen Strukturen angegriffen würden. ❷ Grundsätzlich ist es zurzeit schwierig bis unmöglich, Transkriptionsfaktoren effizient und spezifisch zu inhibieren. Somit wäre es ideal, Surrogatmarker zu identifizieren, die CSC an deren Oberfläche markieren, wodurch diese nicht nur identifiziert, sondern auch leicht angreifbar gemacht werden können.

## 2.4. Oberflächenmarker von *Cancer Stem Cells*

### 2.4.1. Bisher untersuchte *Cancer Stem Cell* Marker beim kolorektalen Karzinom

Durch Oberflächenmarker, die spezifisch für CSC sind, wird eine Identifikation markierter (Tumor-) Zellen möglich. Weiterhin wird es auf diese Weise ermöglicht, diese Zellen weiter zu untersuchen. Erstmals wurden Krebszellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften in Verbindung mit Studien zur akuten myeloischen Leukämie nachgewiesen. Es wurde entdeckt, dass diese Zellen durch den Phänotyp CD34+/ CD34- charakterisiert waren [30, 31]. Später konnte CD133 als potentieller CSC Marker unter anderem bei Hirntumoren [37], Prostatatumoren [38] und kolorektalen Tumoren identifiziert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein kleiner Teil von CD133+ Darmkrebs-Zellen über Tumor-initiiierende Fähigkeiten, Selbsterneuerung und Differenzierung verfügte [32, 33]. Erwartungsgemäß spielt CD133 als prognostischer Faktor in KRK eine Rolle, dessen funktioneller Einfluss allerdings noch unklar ist [39, 40]. Innerhalb der CD133+ Zellpopulationen zeigten Zellen mit EpCAM<sup>high</sup>/ CD44+ Oberflächenprofil in immundefizienten Mäusen ein hohes Potential für Tumor-Initiation. Weitere Marker, die Zellen mit Eigenschaften von CSC in KRK identifizieren können sind CD166 [41] oder CD44 [42]. Die Bedeutung von CD44 wurde in experimentellen Untersuchungen manifestiert. Bereits eine einzige CD44+ Zelle konnte in vitro Tumorsphäroide mit Stammzellen-ähnlichen Eigenschaften generieren und in immundefizienten Mäusen zu Tumoren mit den ursprünglichen Eigenschaften des Primärtumors induzieren. Vermeulen zeigte, dass CD133+ Darmkrebs-Zellen aus heterogenen Zellpopulationen bestehen und dass, obwohl alle Zellen CD133 exprimierten, verschiedene Subpopulationen CD166, CD44, CD29, CD24 oder Lgr5 exprimierten sowie nukleäres  $\beta$ -Catenin aufwiesen. Hierbei wiesen CD133+ und CD24+ Zellen klonogenes Potential und multipotente Differenzierung auf. Während der Differenzierung wurde CD133 und CD24 am schnellsten herabgeregt, gefolgt von

CD44. Die Oberflächenexpression von CD29 und CD166 veränderte sich hierbei nur gering [43, 44]. Zusammengefasst wurde bisher eine Reihe potentieller CSC-Markern untersucht. Da jedoch alle bisher beschriebenen Marker gleichzeitig exprimiert zu sein scheinen [44], stellt sich die Frage nach dem geeignetsten molekularen CSC-Marker, um in Folge eine bessere Identifizierungs- und Angriffsmöglichkeit für weitergehende Untersuchungen und zu einer mehr zielgerichteten Therapie zur Verfügung zu haben.

#### **2.4.2. Hypothese**

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die potentiellen Tumorstammzell-Marker CD29 und CD24 näher untersucht. Ziel war die Klärung der Frage, ob CD29 und CD24 geeignete Marker darstellen, um Tumorstammzellen in situ nachzuweisen. Hierzu wurde die Expression von CD29 und CD24 in einer Auswahl von histologischen Schnitten kolorektaler Karzinome überprüft. Sollten die beiden Marker spezifisch CSC erkennen, würde man gemäß der Annahme, dass CSC die Tumor- und Metastase-treibenden Kräfte von Tumorerkrankungen darstellen, davon ausgehen, dass die Expression von CD29 und CD24 mit der Überlebenszeit der Patienten korreliert.



### III. Material und Methoden

#### 3.1. Patientenkollektiv

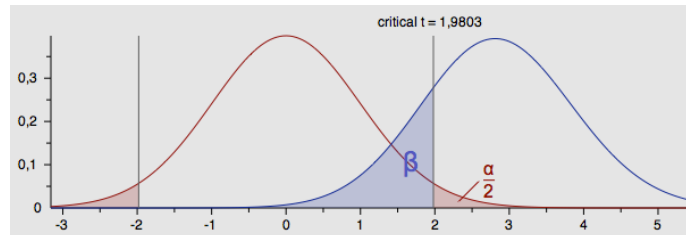
Basis für die Untersuchungen der vorliegenden Doktorarbeit stellte eine retrospektive Auswahl aus Patientenfällen mit der Diagnose kolorektales Karzinom dar, die sich zwischen 1994 und 2005 an der Ludwig-Maximilians-Universität München einer kurativen, d.h. vollständigen Tumorresektion mit Ziel einer vollständigen Heilung unterzogen. Von jedem Fall existierten Formalin-fixierte in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben des Primärtumors. Es wurden ausschließlich mäßig differenzierte Karzinome der Kategorie G2 bzw. G3 gemäß WHO-Klassifikation eingeschlossen. Alle Fälle entsprachen der *staging*-Kategorie UICCII/AJCC 2a (T3N0M0). Sämtliche klinischen Daten (*follow-up*, Überleben) wurden durch das Tumorregister München (Prof. Dr. Jutta Engel) im Jahr 2009 zur Verfügung gestellt. Patienten, die innerhalb der ersten 3 Monate nach Tumorresektion verstarben, wurden von der Studie ausgeschlossen, weil nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Todesursache keine Folge des Tumorleidens, sondern des operativen Eingriffs war.

Die Festlegung der Größe des untersuchten Kollektivs basierte auf der Basis der folgenden Parameter: ❶ die Untersuchung hatte einen assoziativen Charakter, wobei die Ergebnisse auf der Basis immunhistochemischer Färbungen gewonnen wurden, ❷ die Färbeintensitäten wurden über einen semiquantitativen *Score* ermittelt, ❸ für die Korrelation der Färbungen mit dem 5-Jahres Überleben der Patienten wurde eine mittelgroße Effektgröße von  $\rho=0.25$  ( $\rho\leq 0.2$ : kleiner-,  $\rho\leq 0.5$ : mittlerer-,  $\rho\leq 0.8$ : großer Effekt bestimmbar) angenommen, ❹ die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fehler wurden zweiseitig mit den in *life sciences* üblichen Werte von 5% und 20% angenommen, was ❺ eine Power ( $1-\beta$ ) von 0.8 ergab. Aus diesen Parametern wurde unter Annahme eine t-Verteilung der Messergebnisse mit Hilfe der Software G\*Power v.3.17 [45] eine minimale Größe des Patientenkollektivs von  $N=120$  bestimmt (Abb. 5).

Für die Untersuchung konnten 156 Patientenfälle aus dem Archiv des Pathologischen Instituts rekrutiert werden, sodass sich rechnerisch in dem gewählten Statistikmodell eine geringere Effektgröße von  $\rho=0.2202$  ergab, d.h. dass in dieser Konstellation auch kleinere Effekte messbar gemacht werden konnten. Das Alter der Patienten lag bei Tumordiagnose zwischen 47 und 92 (Median 70) Jahren. Die mittlere Beobachtungszeit betrug 6,5 Jahre, innerhalb derer 29 (18,6%) Patienten tumorbedingt verstarben und in 39 Fällen (25%) eine Progression auftrat.



A



B Einstellungen G\*-Power

Correlation: Point biserial model

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input:

Tail(s) = Two

Effect size |  $\rho$  | = 0.25 $\alpha$  err prob = 0.05Power (1-  $\beta$  err prob) = 0.80

Output:

Noncentrality parameter  $\delta$  = 2.8284271

Critical t = 1.9802722

Df = 118

Total sample size = 120

Actual power = 0.8010495

**Abb. 5:** Berechnung der minimalen Kollektivgröße für die Untersuchung. Auf der Annahme einer t-Verteilung der Ergebnisse, einer zweiseitigen Fehleranalyse von  $\alpha=5\%$  und  $\beta=20\%$  ergab sich eine minimale Größe des Patientenkollektivs von  $N=120$ . A Verteilungsdiagramm der beiden Parametergruppen (rot: Überleben 5 Jahre oder weniger; blau: mehr als fünf Jahre), B Für die Powerberechnung eingegebene Werte (input) sowie die von G\* Power errechneten Werte (output).

### 3.2. Western Blotting

Vor Einsetzen von Antikörpern in immunhistochemische Färbungen wurde zunächst mit Hilfe der Western Blot Technik geprüft, ob die Antikörper Spezifität für ihr Zielantigen zeigten, um Fehlinterpretationen zu verringern bis zu vermeiden. Für die Antigene CD24 und CD29 sind folgende Charakteristika bekannt:

#### CD24

ist ein kleines GPI-linked membrane sialo-glycoprotein Protein (80 Aminosäuren) von 8.097 kdal.

#### CD29

ist die  $\beta$ -1 Untereinheit des Integrins (798 Aminosäuren) mit einem Molekulargewicht von 88.415 kdal.

Von einem spezifischen Antikörper wird erwartet, dass er eine einzige Bande ergibt, die auf der richtigen Laufhöhe im Gel wandert. Zwischen Laufweite und Molekulargewicht

der Proteine besteht eine logarithmische Proportionalität. Dabei wird eine Zuordnung zwischen beiden Parametern durch einen molekularen Standard erzielt, der eine Mischung von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht darstellt.

Für den Western Blot wurden Proteingemische zunächst

- 1) in denaturierenden diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt,
- 2) auf eine proteinbindende Membran übertragen und dadurch immobilisiert
- 3) unter Einsatz von Antikörpern detektiert.

### **1) Elektrophoretische Auftrennung**

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe von denaturierender, reduzierender SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat – Poly Acrylamid Gel Elektrophorese). Dazu wurde zwischen zwei im Abstand von 1,5 mm fixierten Glasplatten zunächst ein Trenngel (Tab. 2) gegossen und dieses mit Ethanol überschichtet, um eine glatte Oberkante des Gels zu erzeugen. Die Polymerisation benötigte unter den gewählten Bedingungen circa 20 Minuten. Anschließend wurde das Ethanol abgegossen und nun auf das Trenngel ein Sammelgel (Tab. 2) gegossen, in dem mit Hilfe eines Kamms Taschen geformt wurden, in die später die proteinhaltigen Zell-Lysate (Tab. 3) auftragen wurden. Die Polymerisation erfolgte unter den gewählten Bedingungen wiederum in circa 20 Minuten. Die Glasplatten wurden daraufhin in einer Haltevorrichtung in die Gellaufkammer des verwendeten Minigel-Systems (BioRad Mini Trans-Blot System) eingesetzt. Die Gellaufkammer wurde mit Laufpuffer (Tab. 2) befüllt, der Kamm entfernt und die entstandenen Taschen gespült und auf Intaktheit geprüft.

## 1) Trenngel 10%

Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (Roth)	30%	5 ml
4xTris-HCl, pH 8,8	4x	3,75
H <sub>2</sub> O		6,25 ml
APS	10%	200 µl
TEMED	100%	40 µl
		15 ml

## Sammelgel

Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (Roth)	30%	650 µl
4xTris-HCl, pH 6,8	4x	1,25 ml
H <sub>2</sub> O		3,05 ml
APS	10%	100 µl
TEMED	100%	20 µl
		5 ml

## Laufpuffer (5x Laemmli-Puffer)

Tris Base	15,1 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

## 2) 10x Transferpuffer

Tris Base	30,2 g
Glycin	144,2 g
H <sub>2</sub> O	ad 900 ml

## 1x Transferpuffer

H <sub>2</sub> O	80%
10 x Transferpuffer	10%
Methanol	10%

**Tab. 2:** Western Blot: Puffer und Lösungen

- 1) Für die PAGE (polyacrylamide gelelectrophoresis): Gele, Laufpuffer
- 2) Für den Transfer der Proteine auf die Western Blot Membran: Transferpuffer

(Mengenangaben gemäß Western Blot Protokoll des Pathologischen Instituts der LMU, erstellt von Achim Schäffauer)

Zell-Linien	Proteinkonzentration der beim Western Blot eingesetzten Lysate	
	CD29	CD24
Hela	2,50 µg/µl	2,50 µg/µl
HT29	0,66 µg/µl	1,99 µg/µl
SW620	0,82 µg/µl	2,62 µg/µl
LS174T		2,26 µg/µl
293T		3,02 µg/µl
RPMI8866	0,72 µg/µl	

**Tab. 3:** eingesetzte Zelllinien und Volumina der eingesetzten Proteinlysate in Western Blots

Parallel zur Polymerisation wurden die Proben vorbereitet. Dazu wurde ein Volumen (y µl), das 10µg Protein enthielt, mit einem entsprechenden Volumen (x µl) an 4xRotiload Puffer gemischt (2):

$$x \text{ µl RLB} = \frac{1}{4} \cdot (x \text{ µl RLB} + y \text{ µl PL}) \quad (1)$$

$$x \text{ µl RLB} = \frac{1}{3} y \text{ µl PL} \quad (2)$$

PL – Proteinlysate, RLB – 4x Roti-load Puffer

Das Gemisch wurde für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren, und anschließend sofort auf Eis gestellt.

In die Taschen wurden Zell-Lysate der Zelllinien HeLa, HT29, SW620, LS174T, 293T und RPMI8866 (Tab. 3) sowie 5µl Molekulargewichtsmarker (DualColor, BioRad) pipettiert. Anschließend wurden die Proteine im elektrischen Feld für 20 Minuten bei 65 V, dann bei 120 V für circa 1h 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetrennt.

## **2) Transfer und Immobilisierung der Proteine auf einer Membran**

Nach Auftrennung der Proteinlysate wurden diese auf eine Poly-Vinyl-Di-Fluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) übertragen und dadurch gleichzeitig immobilisiert. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und in die Kassette einer Blotkammer eingesetzt. Zur späteren Orientierung wurden sowohl die linke obere Ecke des Gels als auch die entsprechende Ecke der Membran abgetrennt. Die Kassette wurde zusammen mit einem gefrorenen Kühlelement in die Blotkammer eingesetzt und ein Rührfisch in die Kammer gelegt. Anschließend wurde die Blotkammer mit frisch angesetztem 1x Transferpuffer (Tab. 2) befüllt und der Blot im Kühlschrank (4°C) für 1 Stunde bei 100V unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer laufen lassen. Durch die Kühlung wurde der beim Transfer entstehenden Wärmeentwicklung gegengearbeitet, die sich ungünstig auf das Transferverhalten auswirkt, da durch Wärme die Diffusion der Proteine im Gel gesteigert wird. Nach Abschluss des Transfers wurde die Kassette vorsichtig geöffnet und der Erfolg des Transfers überprüft. Da der eingesetzte Proteinstandard vorgefärbt war, konnte der Erfolg der Transfers sofort augenoptisch direkt kontrolliert werden.

## **3) Detektion der Proteine**

Die Membran wurde zunächst in 1xTBS/T-0,01% Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, um eventuelle Gelreste zu entfernen. Dann wurde die Membran mit 6 ml Blotto (5%) Milchpulver in 1xTBS/T-0,01% Puffer) für eine Stunde inkubiert, um so die Areale der Membran, die kein Protein gebunden hatten, durch unspezifisches Binden von Milchproteinen zu blockieren. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4° die Inkubation der Membran mit dem gewünschten Primärantikörper (Tab. 4). Am nächsten Morgen wurde die Membran erneut in 1xTBS/T-0,01% Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 1,5 (CD29) bzw. 3 Stunden (CD24) bei 4°C (Tab. 5). Anschließend wurden die Membranen erneut gewaschen.

Antikörper	Klon	Verdünnung	Hersteller	Spezies
Anti-CD24	3H1143	1:1000 (3µl AK in 3000µl 5% Blotto)	Santa Cruz	Maus
Anti-CD29	EPR10404	1:1000 (3µl AK in 3000µl 5% Blotto)	Epitomics	Kaninchen
Anti- $\beta$ -Actin	AC-15	1:1000 (3µl AK in 3000µl 5% Blotto)	Sigma-Aldrich	Maus
Anti-Maus-HRP		1:10.000 (0,3µl AK in 3000µl 5% Blotto)	Thermo Scientific	Kaninchen
Anti-Rabbit-HRP		1:10.000 (0,3µl AK in 3000µl 5% Blotto)	Pierce	Maus

**Tab. 4:** Spezifikation der eingesetzten Antikörper

In abschließenden Schritten wurden nun die durch die spezifische Bindung des Erstantikörpers definierten Antikörperkomplexe sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran mit der Oberseite nach oben auf Klarsichtfolie gelegt und Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore, 1 ml/Membran), das an den Sekundärantikörper bindet, auf die Membran aufgetragen. Die Membran wurde mit einer zweiten Klarsichtfolie abgedeckt und in einer Belichtungskassette fixiert. Luftblasen wurden zuvor herausgestrichen. Die Belichtung erfolgte in der Dunkelkammer, indem ein Film (Amersham Hyperfilm ECL) für 2 (CD29) bzw. 5 (CD24) Minuten direkt auf die Membran aufgelegt wurde. Schließlich wurde der Film entwickelt.

Um im Falle von negativen Proben nachzuweisen, dass der Ausfall des Nachweises nicht daran lag, dass kein Protein aufgetragen worden war, wurde zum Nachweis aufgetragenen Proteins das in allen Zellen exprimierte  $\beta$ -Actin nachgewiesen. Hierzu wurde die jeweilige verwendete Membran durch Waschen und Inkubation mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer von bisher gebundenen Antikörpern befreit und anschließend wie in Tabelle 5 beschrieben mit Hilfe eines  $\beta$ -Actin spezifischen Antikörpers (Tab. 4) inkubiert. Bei der Inkubation dieses Antikörpers erfolgten alle Schritte, also auch das Waschen und die Antikörperinkubation bei 4°C.

CD29		CD24
RPMI 8866 (Negativkontrolle) Hela Whole Cell Lysate (Positivkontrolle) HT29 SW620	Zelllysate	293T (Negativkontrolle) Hela Whole Cell Lysate (Positivkontrolle) HT29 SW620 SL174T
initial 65 V, anschließend 120 V bei Raumtemperatur	Gellauf	initial 65 V, anschließend 120 V bei Raumtemperatur
100 V bei 4°C	Transfer	100 V bei 4°C
1 h mit 6ml 5% Blotto bei Raumtemperatur	Blockieren	1 h mit 6ml 5% Blotto bei Raumtemperatur
	Inkubation mit Primär-Antikörper	
4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C	Waschen	4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C
	Inkubation mit Sekundär-Antikörper	
4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C	Waschen	4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C
2 Minuten	Belichtung	5 Minuten
4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C	Waschen	4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C
15 Minuten in 3ml Restore™ Western Blot Stripping Buffer bei 4°C	Strippen	15 Minuten in 3ml Restore™ Western Blot Stripping Buffer bei 4°C
4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C	Waschen	4 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C
30 Minuten mit 6ml 5% Blotto bei 4°C	Blockieren	30 Minuten mit 6ml 5% Blotto bei 4°C
	Inkubation mit $\beta$ -Actin Primär Antikörper	
3 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C	Waschen	3 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C
	Inkubation mit $\beta$ -Actin Sekundär Antikörper	
3 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C	Waschen	3 x 5 Minuten in 10ml 1xTBS/T 0,01% bei 4°C
30 Sekunden	Belichtung	90 Sekunden

**Tab. 5:** Übersicht über die unterschiedlichen Vorgehensweisen für die Detektion von CD29 und CD24 bzw.  $\beta$ -Actin mittels Western Blot

### 3.3. Immunhistochemie

#### 3.3.1. Zelllinien

Zur Testung und Optimierung der Antikörper auf FFPE-Gewebe wurde versucht, die Spezifität der Antikörper unter Bedingungen zu testen, die denen an FFPE Geweben am besten entsprechen. Dazu wurden Zelllinien, die CD29 bzw. CD24 exprimieren, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und anschließend in 2 $\mu$ m dicken Schnitten auf Superfrost-Objekträger übertragen. Die immunhistochemische Färbung erfolgte auf einem Ventana Benchmark XT System gemäß Standardprotokoll des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München/ Großhadern. Die optimale Vorbehandlung und Verdünnung der Antikörper war zuvor durch systematische Testfärbungen der Zell-Linien erhoben worden (Annegret Schäfer; Pathologisches Institut) und wurde wie folgt gewählt:

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Antigen-Retrieval
CD29	Epitomics Clone EPR10404 Rabbit monoclonal IgG	1:400	CC1
CD24	Acris Clone SN3b Mouse monoclonal IgM	1:50	Protease

**Tab. 6:** Übersicht immunhistochemische Färbung: Für die eingesetzten Antikörper wurden verschiedene Vorgehen als optimal getestet

Durch die immunhistochemische Färbung der Zelllinien konnte überprüft werden, ob die jeweiligen Antikörper spezifisch binden. Da der im Western Blot überprüfte CD24 Antikörper nicht zum Einsatz in der Immunhistochemie geeignet war, wurde hierfür der CD24 Antikörper Clone SN3b von Acris gewählt. Dessen Spezifität wiederum wurde durch die Expression in den getesteten CD24 positiven bzw. -negativen Zelllinien quergeprüft.

### 3.3.2. Gewebeproben

Schließlich wurden die Bedingungen auf humanes Gewebe übertragen, um die Verteilung der Färbung zu bestimmen. Denn aus dieser konnte abgeleitet werden, ob für die Analyse des Patientenkollektivs ganze Schnitte - bei heterogenem Färbemuster - oder TMA (Tissue Micro Arrays) – bei homogenem Färbemuster - eingesetzt werden konnten.

### 3.3.3. Kollektiv

Von jedem Patienten existierten Formalin-Fixierte in Paraffin eingebettete Gewebeproben des Primärtumors. Bei Überprüfung des Färbemusters war zuvor für CD24 eine heterogene Verteilung festgestellt worden, weshalb eine Analyse dieses Antigens nicht mittels TMAs durchgeführt werden konnte. Daher wurden für die Analyse dieses Antigens von jedem Paraffinblock 2µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger gezogen. Die Beurteilung des Färbeverhaltens für CD29 ergab ein homogenes Muster, so dass für die Färbung mit anti-CD29 Tissue Micro Arrays eingesetzt wurden, die bereits aus vorhergehenden Untersuchungen zur Verfügung standen. Hierbei lagen pro Patientenfall zwei Stenzen des Haupttumors sowie drei Stenzen aus dem Bereich der Invasionsfront vor. Vorbehandlung und Verdünnung

erfolgten entsprechend dem vorher bestimmten Optimum gemäß Tab. 6. Die immunhistochemische Färbung wurde entsprechend dem Standardprotokoll des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München/ Großhadern auf einem Ventana Benchmark XT System durchgeführt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte unter dem Mikroskop ohne Kenntnis des klinischen Verlaufs der Patienten. Hierzu wurde unter Berücksichtigung der Anzahl gefärbter Tumorzellen, Intensität und Lokalisation der Färbung jeweils separat für die Expression von CD29 bzw. CD24 ein Bewertungsmaßstab (Score) erarbeitet und dieser für jeden Patientenfall bestimmt.

### **3.4. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme SPSS® Statistics, Version 22, MedCalc Statistical Software, Version 15.8. und Microsoft Excel®. Als Signifikanzniveau wurden 5% ( $p \leq 0.05$ ) festgelegt.

Zunächst erfolgte eine deskriptive Analyse, um einen Überblick über das generelle Färbeverhalten von CD29 und CD24 zu erlangen.

Um potentielle Zusammenhänge zwischen klinischen Variablen aufzudecken, wurden die Daten anhand von Kreuztabellen untersucht. Die Prüfung auf Unabhängigkeit erfolgte bei Variablen mit mehr als zwei Ausprägungen mittels des  $\chi^2$ -Tests nach Pearson und bei Variablen mit zwei Ausprägungen mittels Fishers Exakten Tests.

Anschließend erfolgte eine univariate Überlebensanalyse gemäß der Methode nach Kaplan-Meier, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Marker-Expression und tumorspezifischem Überleben bzw. Progression festzustellen. Die Gruppen wurden mit Hilfe des log-rank-Tests verglichen.



## IV. Ergebnisse

### 4.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Untersucht wurde ein Kollektiv von 156 Patientenfällen (Tab. 7), wovon 74 männlichen- und 82 weiblichen Geschlechts waren. Das Alter der Patienten bei Tumordiagnose lag zwischen 47 und 92 Jahren, wobei der Median bei 70 Jahren lag.

Die Mehrzahl der Primärtumoren war mit 88,5% im Kolon (C18), 0,6% am rektosigmoidalen Übergang (C19) und 10,9% im Rektum (C20) lokalisiert.

Hinsichtlich des *Gradings* wurden ausschließlich mäßig differenzierte Adenokarzinome der Kategorien G2 und G3 einbezogen. Alle Fälle waren T3N0M0, hatten also zum Zeitpunkt der Primärdiagnose weder Metastasen in den regionären Lymphknoten (N) noch Fernmetastasen (M), was einem UICC IIa *Staging* entspricht.

Bei 39 Patienten kam es innerhalb des Beobachtungszeitraumes zur Progression, hiervon in 24 Fällen zur Metastasierung, in 4 Fällen zum Rezidiv und in 9 Fällen lag keine Information zur Art der Progression vor. Die mittlere Zeit bis zum Auftreten einer Progression betrug 1,97 Jahre. 29 Patienten verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraumes tumorbedingt. Die mittlere Beobachtungszeit aller Patienten betrug 6,15 Jahre.

Diese Kennwerte entsprechen den Werten großer UICC IIa Kollektive [9]. Deshalb kann das hier eingesetzte Kollektiv als repräsentativ für die normale Population angesehen werden, sodass die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen einen Rückschluss auf die Gesamtpopulation rechtfertigten.

	Patienten	Prozent(%)
<b>Gesamt</b>	156	100
<b>Geschlecht</b>		
männlich	74	47,4
weiblich	82	52,6
<b>Alter bei Diagnose (Median)</b>	70	
<b>Lokalisation</b>		
Kolon (C18)	138	88,5
rektosigmoidaler Übergang (C19)	1	0,6
Rektum (C20)	17	10,9
<b>Grading</b>		
G2	138	88,5
G3	18	11,5
<b>T-Status</b>		
T3	156	100
<b>N-Status</b>		
N0	156	100
<b>M-Status</b>		
M0	156	100
<b>Progression</b>	39	25
Metastasierung	24	15,4
Rezidiv	4	2,6
Metastasierung + Rezidiv	2	1,3
keine Angabe	9	5,8
<b>Zeit bis Progression (in Jahren, Median)</b>	1,97	
<b>Tod (tumorbedingt)</b>	29	18,6
<b>Zeit bis Tod (in Jahren, Median)</b>	3,86	
<b>Beobachtungszeit (in Jahren, Median)</b>	6,15	

**Tab. 7:** Zusammensetzung des Patientenkollektivs

## 4.2. Ergebnisse der Antikörper-Tests

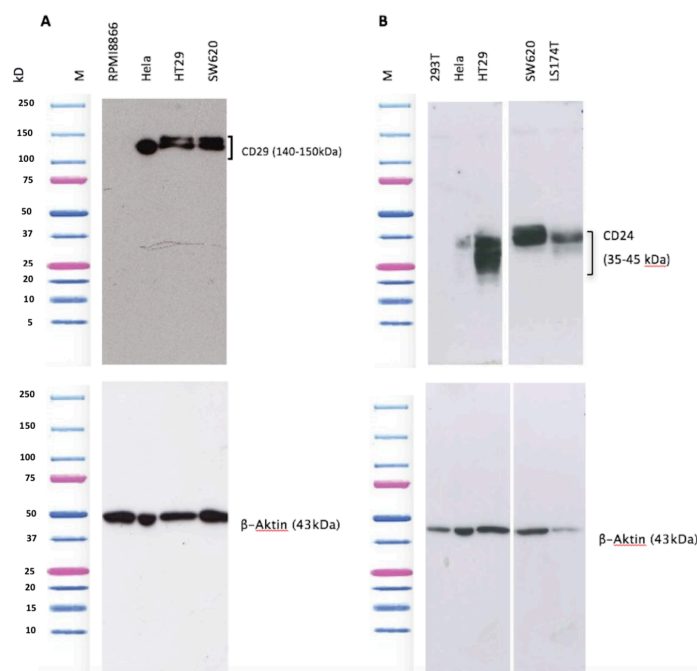
### 4.2.1. Spezifischer Nachweis von CD29 durch Epitomics anti-CD29 clone EPR1040Y und von CD24 durch Santa Cruz anti-CD24 clone 3H1143

Bevor ein Antikörper in der Immunhistochemie eingesetzt wird, ist es von Vorteil, zunächst seine Spezifität zu bestimmen, da in einer immunhistochemischen Färbung lediglich Bindung (Färbung) bzw. Nicht-Bindung (keine Färbung) dargestellt werden können und daher keine Aussage über die Spezifität der Bindung getroffen werden kann. Deshalb wurden die verwendeten Antikörper zunächst auf spezifische Bindung hin untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate von Zelllinien eingesetzt, die CD29 bzw. CD24 exprimierten bzw. nicht exprimierten.

Für CD29 wurden Proteinlysate der CD29-exprimierenden humanen Kolon Adenokarzinom Zelllinien HT29, SW620 [46] und der Cervixkarzinom Zelllinien HeLa Whole Cell Lysate als Positivkontrolle untersucht. Die CD29-negative humane B-Lymphozyten-Zelllinie RPMI8866 [47] diente als Negativkontrolle. Das

Molekulargewicht von CD29 beträgt 140-150 kDa (kilo-Dalton). Erwartungsgemäß zeigte sich bei dem eingesetzten CD29 spezifischen Antikörper (Epitomics anti-CD29 clone EPR1040Y) auf der entsprechenden Laufhöhe nur in Kombination mit den CD29-positiven Proteinlysaten aber nicht mit dem CD29-negativen Lysat eine Bande. Zur Überprüfung des Proteingehalts aller Lysate wurde der jeweilige  $\beta$ -Actin-Gehalt bestimmt. Das Ergebnis zeigte einen gleichmäßigen Proteingehalt aller vier Lysate. Somit wurde nachgewiesen, dass der eingesetzte CD29 Antikörper sein Antigen spezifisch binden konnte (Abb. 6).

Für CD24 wurden Proteinlysate der CD24 exprimierenden kolorektalen Zelllinien HT29, SW620, LS174T [46] und der Cervixkarzinom Zelllinie HeLa (*whole Cell Lysate*) als Positivkontrolle eingesetzt. Lysate der Zell-Linie 293T dienten als Negativkontrolle [48]. Der untersuchte Antikörper (Santa Cruz anti-CD24 clone 3H1143) band bei den CD24-positiven Zelllinien auf der entsprechenden Höhe, nicht jedoch im CD24-negativen Lysat, wobei dies nicht auf unterschiedlichen Mengen an aufgetragenem Protein basierte, denn eine Überprüfung des Proteingehalts mittels  $\beta$ -Actin zeigte, dass bei allen untersuchten Lysaten vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen worden waren. Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass dieser Antikörper sein Antigen ebenfalls spezifisch binden konnte (Abb. 6).



**Abb. 6: anti-CD29 und anti-CD24 Antikörper erkennen ihre Antigene spezifisch.**

**A** Sowohl der anti-CD29 spezifische Antikörper (Epitomics, clone EPR1040Y) also auch **B** anti-CD24 (Santa Cruz, clone 3H1143) erkennen ihr jeweiliges Antigen spezifisch. Ein Ausfall der Bindung liegt nicht am Mangel an Protein, wie ein Nachweis mit anti- $\beta$ -Aktin spezifischem Antikörper (Sigma-Aldrich, clone AC-15) zeigt. M=Marker (DualColor, BioRad)

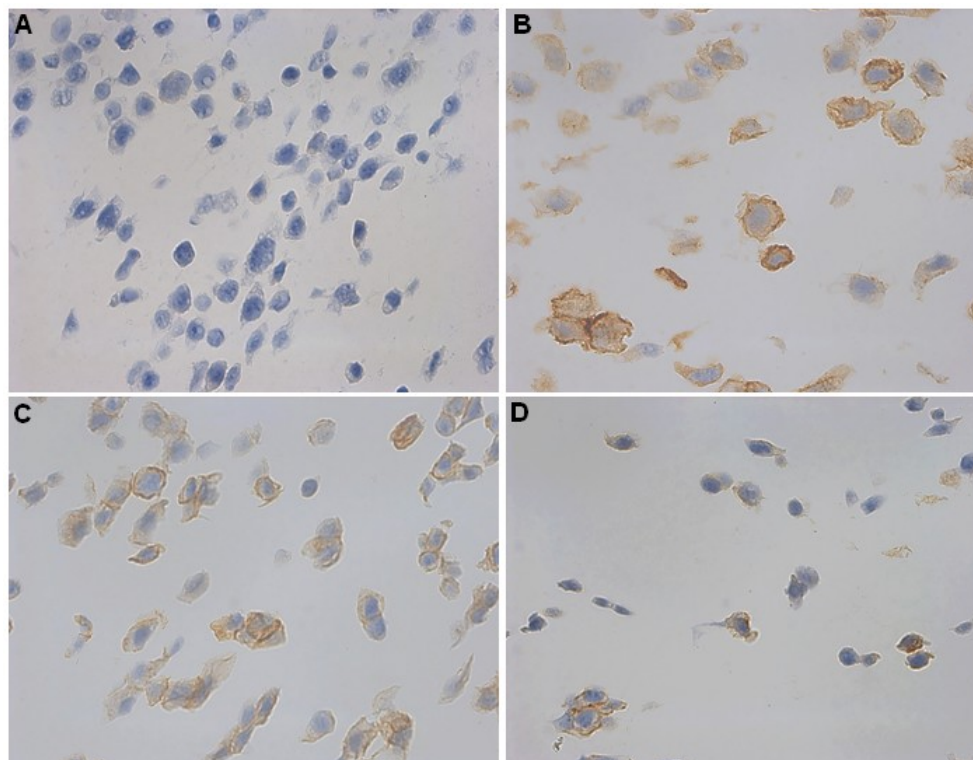
#### 4.2.2. Spezifische immunhistochemische Expression der Antikörper in den überprüften Zelllinien

Da die Färbung der humanen Gewebe an FFPE-Geweben erfolgen sollte, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die Antikörper auch unter FFPE-Bedingungen ihre Spezifität beibehielten. Nachdem aus den Western-Blot Untersuchungen die Expressionsmuster von CD24 und CD29 bekannt waren, wurden verschiedene Zelllinien Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet (Tab. 8).

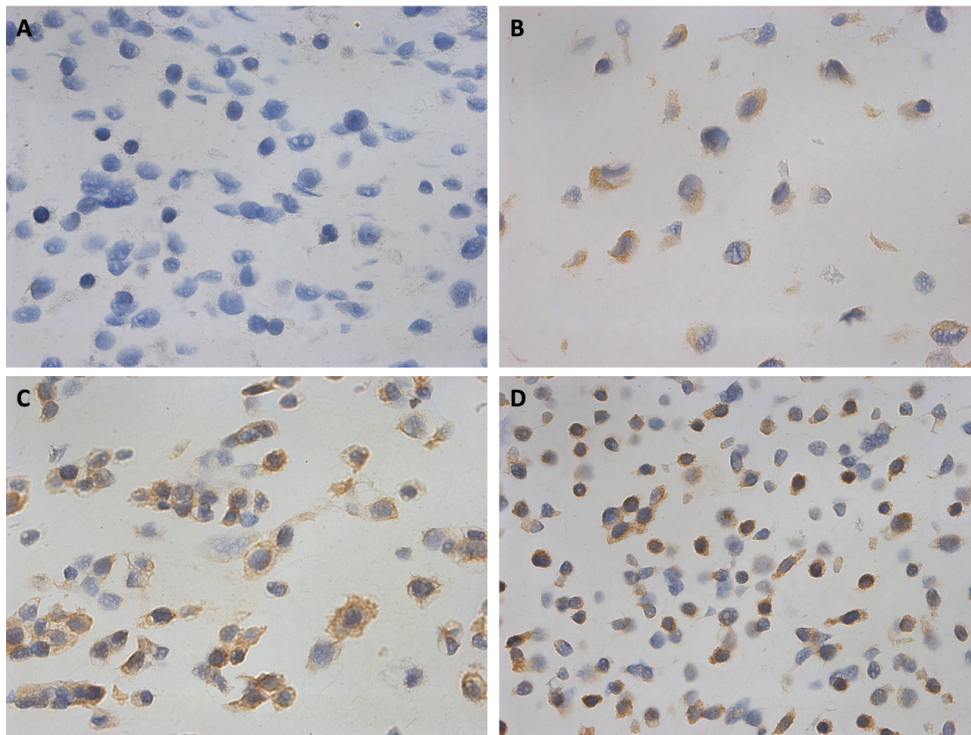
Zelllinie	CD29	IHC-Färbung	CD24	IHC-Färbung
293T			negativ	negativ
HeLa	positiv	positiv	positiv	positiv
HT29	positiv	positiv	positiv	positiv
LS174T			positiv	positiv
RPMI8866	negativ	negativ		
SW620	positiv	positiv		

**Tab. 8:** Eingesetzte FFPE-Zelllinien und deren Ergebnisse in der immunhistochemischen Färbung

Es zeigte sich, dass sich die Ergebnisse der Western Blots in den immunhistochemischen Färbungen für CD29 (Abb. 7) und CD24 (Abb. 8) widerspiegeln (Tab. 8).



**Abb. 7:** Ergebnis der immunhistochemischen Färbung der Zelllinien RPMI8866 (A), HeLa (B), HT29 (C) und SW620 (D) mit anti-CD29. Vergrößerung 63-fach.



**Abb. 8:** Ergebnis der immunhistochemischen Färbung der Zelllinien 293T (A), HeLa (B), HT29 (C) und SW620 (D) mit anti-CD24. Vergrößerung 63-fach.

Insgesamt konnten die beiden gewählten Antikörper-Klone nun für einen spezifischen immunhistochemischen Nachweis eingesetzt werden.

#### 4.2.3. Expressionsmuster von CD29 und CD24 in Gewebeproben

In einem letzten Vorbereitungsschritt wurde nun das Verteilungsmuster der immunhistochemischen Färbungen für CD24 und CD29 untersucht, da nur bei homogenen Färbungen aufgrund der geringen Geweberepräsentanz TMAs (tissue microarrays) eingesetzt werden können. Für CD29 wurde eine homogene Verteilung des Färbemusters festgestellt, wohingegen sich die CD24-Färbung heterogen zeigte. Somit wurde für die Färbung des zu untersuchenden Kollektivs für CD29 auf TMA zurückgegriffen. Die Färbung mit CD24 erfolgte hingegen auf kompletten Gewebeschnitten.

### 4.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung

#### 4.3.1. Scoring

Für die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte des Patientenkollektivs wurde jeder Patientenfall anhand eines semiquantitativen Scores klassifiziert. Dieser wurde in einem ersten Schritt entwickelt. Seine Basis bildete die mikroskopische Auswertung der Schnitte in Bezug auf Färbeintensität, Verteilung der Färbung in der Übersicht und Lokalisation der Antikörper-Expression. Die Unterteilung erfolgte nachfolgendem Schema (Tab. 9).

Score	CD29			CD24			
	gefärbte Fläche in Prozent	Definition	Intensität	gefärbte Fläche in Prozent	Definition	Intensität	
0	0%	keine Färbung der Tumorzellen	0	0%	keine Färbung der Tumorzellen	0	CD24 low
1	<50%	weniger als 50% der Tumorzellen gefärbt	1	einzelne Zellen	Färbung vereinzelter Zellen	1	
2	>50%	mehr als 50% der Tumorzellen gefärbt	1	20-50%	weniger als 50% der Tumorzellen gefärbt	1	
3	>90%	annähernd alle Tumorzellen gefärbt	2	>50%	mehr als 50% der Tumorzellen gefärbt	2	CD24 high

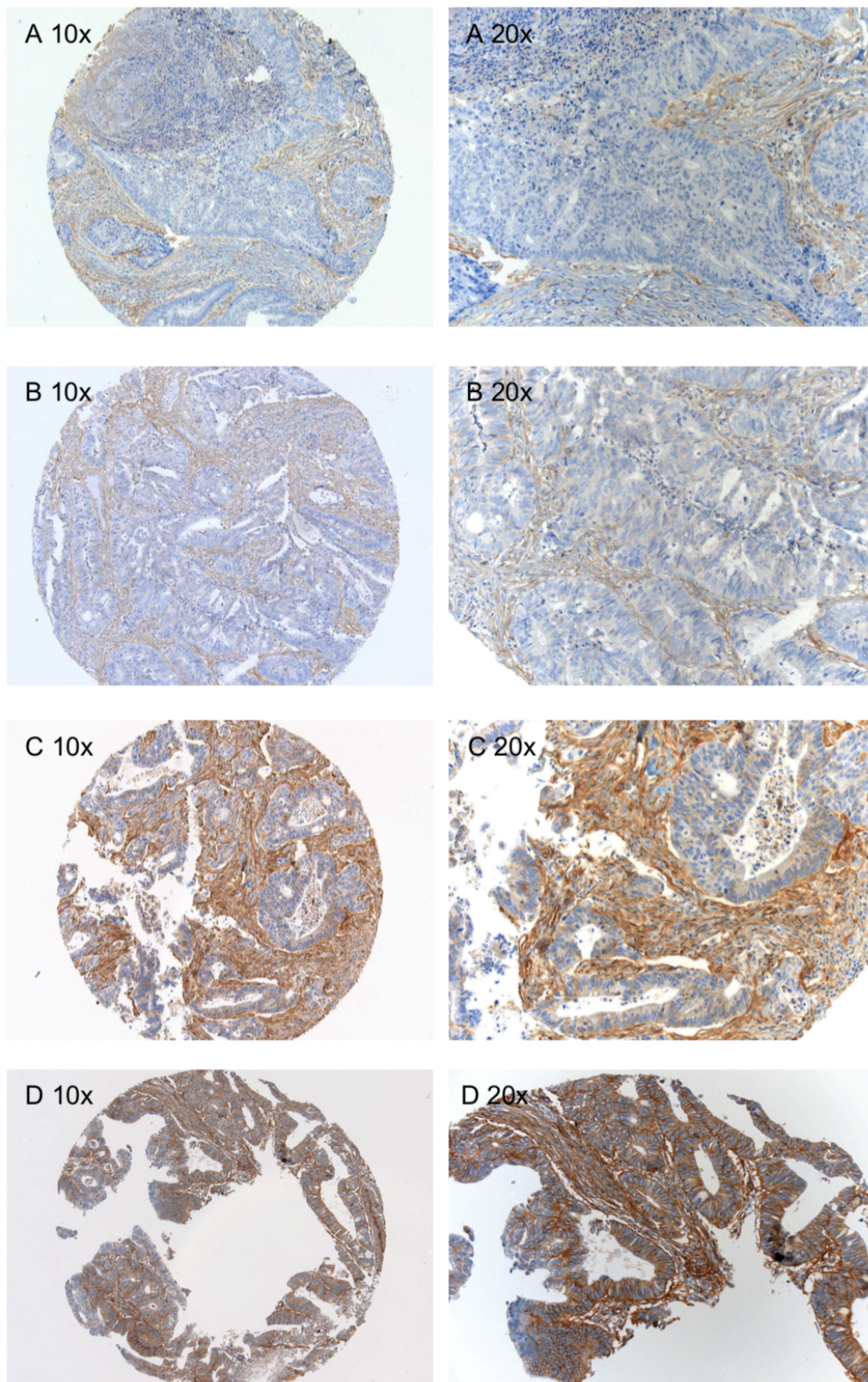
**Tab. 9:** Aufschlüsselung der Scores, die zur Klassifizierung der Marker-Expression beim Patientenkollektiv zur Anwendung kamen.

Die Intensität der Färbung wurde in drei Stufen bewertet, wobei zwischen ❶ keine Färbung (0), ❷ mäßiger Intensität (1) und ❸ hoher Intensität (2) unterschieden wurde (Abb. 9 und Abb. 10). Die gefärbte Fläche in Prozent wurde bei kleiner Vergrößerung vorgenommen, um die Übersicht zu gewährleisten. Weiterhin wurde zwischen ❶ membranöser, ❷ zytoplasmatischer und ❸ nukleärer Immunreaktivität differenziert (Abb. 12 und Abb. 14).

Tumordrüsen wurden als CD29 bzw. CD24 positiv gewertet, wenn eine Färbung entweder apikal an den Drüsenzellen und/oder an der Debris im Drüsenlumen festgestellt werden konnte. Als negativ wurden nur diejenigen Tumordrüsen gewertet, die generell ein immunhistochemisches Signal aufwiesen, das heißt, Fälle des Scores 0 wurden nicht gezählt (Abb. 11 und Abb. 13).

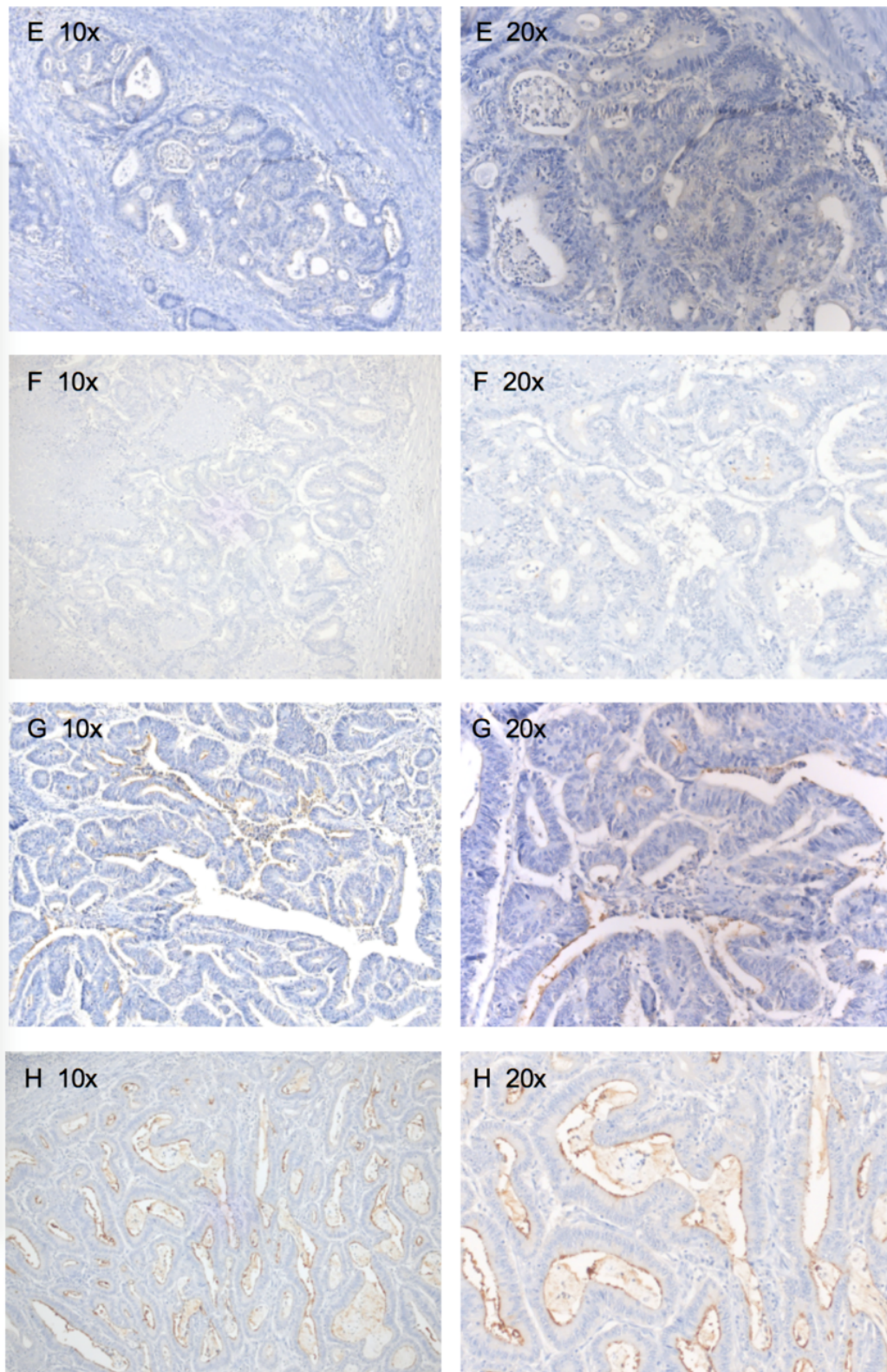
Das Färbeverhalten stellte sich für CD29 insgesamt intensiver dar, wohingegen die CD24 Expression generell schwächer ausfiel. Deshalb wurde für CD24 die Unterteilung in CD24 low (Score 0, 1 und 2) und CD24 high (Score 3) vorgenommen.





**Abb. 9:** Scoring zur Auswertung der CD29-Färbung: Tumoren, die keine Färbung der Tumorzellen aufwiesen, wurden dem Score 0 zugeordnet (A). Tumoren, die weniger als 50% gefärbte Tumorzellen aufwiesen, wurden dem Score 1 zugeordnet (B). Bei einer Färbung von mehr als 50% der Tumorzellen wurde der Fall als Score 2 gewertet (C). Lag eine Färbung von mehr als 90% aller Tumorzellen vor, wurde der Fall als Score 3 gewertet (D).





**Abb. 10:** Scoring zur Auswertung der CD24 Färbung: bei keiner Färbung der Tumorzellen wurde der Fall als Score 0 gewertet (**E**). Bei Färbung einzelner Tumorzellen wurde der Fall als Score 1 gewertet (**F**). Zeigten zwischen 20 und 50% der Tumorzellen eine Färbung, erfolgte die Klassifizierung als Score 2 (**G**). Bei Färbung von deutlich mehr als 50% der Tumorzellen erfolgte die Klassifizierung als Score 3 (**H**). Zur weiteren Klassifikation erfolgte die Unterteilung in CD24 low (Score 0, 1 und 2) und CD24 high (Score 3).



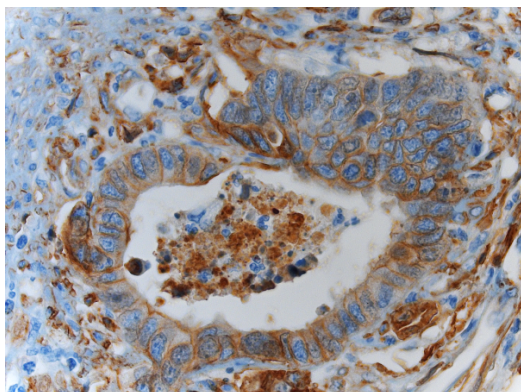
### 4.3.2. Statistische Auswertung

#### 4.3.2.1. Deskriptive Statistik

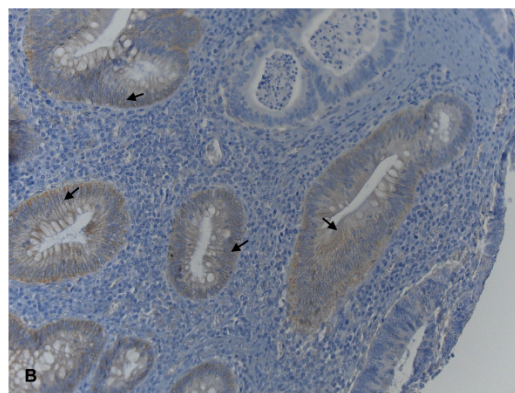
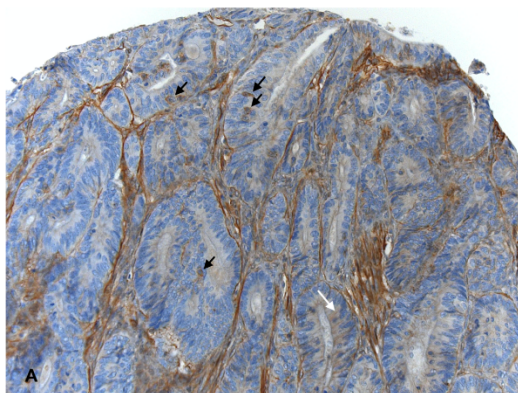
Generell zeigte sich in 132 von insgesamt 156 Fällen eine positive CD29-Färbung. 24 Fälle wurden dem Score 0, 40 dem Score 1, 73 dem Score 2 und 19 dem Score 3 zugeordnet. Eine Färbung der Tumordrüsen war in 82 von 132 CD29-positiven Fällen feststellbar (Tab. 10).

		Fallzahl (n)	Prozent(%)
CD29 Expression	positiv	132	84,6
	negativ	24	15,4
CD29 Score	0	24	15,4
	1	40	25,6
	2	73	46,8
	3	19	12,2
CD29 Lokalisation an Zellstrukturen	Membran	77	49,4
	Membran + Plasma	51	32,7
	Membran + Plasma + Kern	4	2,6
CD29 Färbung an Tumordrüsen	positiv	82	52,6
	negativ	50	32,1

**Tab. 10:** Verteilung der immunhistochemischen Expression von CD29 im Kollektiv



**Abb. 11:** Beispiel einer CD29 positiven Tumordrüse. CD29 Expression tritt sowohl an der luminalen Zellseite als auch in der intraluminären Debris auf. Vergrößerung 63x

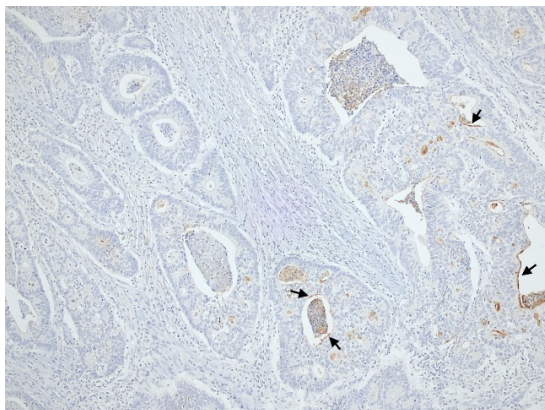


**Abb. 12:** Bei der Beurteilung der Expression von CD29 wurde **A** zwischen nukleärer (schwarze Pfeile) und zytoplasmatischer (weißer Pfeil) und **B** membranöser Färbung unterschieden. Vergrößerung 20x (A) bzw. 40x (B)

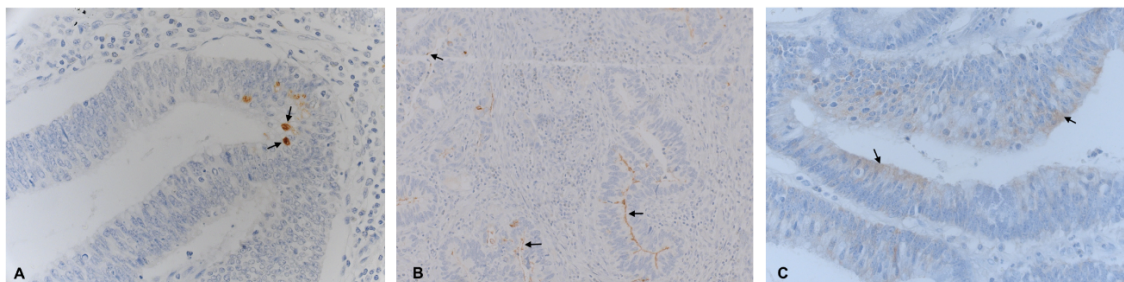
Eine positive CD24-Färbung trat in 124 Fällen auf. Von den 156 Patientenfällen wurden 32 dem Score 0, 47 dem Score 1, 50 dem Score 2 und 27 dem Score 3 zugeordnet. Dies entspricht 129 CD24 low-Fällen und 27 CD24 high-Fällen. Eine Färbung der Tumordrüsen konnte in 117 von 124 CD24-positiven Fällen festgestellt werden (Tab. 11).

		Fallzahl (n)	Prozent(%)
CD24 Expression	positiv	124	79,5
	negativ	32	20,5
CD24 Score	0	32	20,5
	1	47	30,1
	2	50	32,1
	3	27	17,3
CD24 high/low	CD24 high	27	17,3
	CD24 low	129	82,7
CD24 Lokalisation an Zellstrukturen	Kern	3	1,9
	Membran	42	26,9
	Membran + Kern	44	28,2
	Membran + Kern + Plasma	21	13,5
	Membran + Plasma	9	3,2
	Plasma	5	3,2
CD24 Färbung an Tumordrüsen	positiv	117	75
	negativ	7	4,5

**Tab. 11:** Verteilung der immunhistochemischen Expression von CD24 im Kollektiv



**Abb. 13:** Beispiel für als CD24 positiv gewertete Tumordrüsen. CD24 wird sowohl an der luminalen Zellfläche exprimiert (Pfeile) als auch in der Debris. Vergrößerung 10x



**Abb. 14:** Bei der Beurteilung der Expression von CD24 wurde zwischen **A** nukleärer Färbung, **B** membranöser Färbung und **C** zytoplasmatischer Färbung unterschieden. Die membranöse Expression von CD24 trat hierbei hauptsächlich an der luminalen Zellseite auf. Vergrößerung 40x (A, C) bzw. 20x (B)

105 Patientenfälle zeigten sowohl positive CD29 als auch CD24-Färbung. 26 CD29-positive Fälle wiesen gleichzeitig eine CD24 high Färbung auf. 5 Fälle stellten sich als sowohl CD29- als auch CD24-negativ dar.

#### 4.3.2.2. Das Expressionsmuster von CD29 und CD24 korreliert teilweise mit dem Differenzierungsgrad

Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung wurden unter Verwendung von Patienten-Identifikationsnummern für die jeweiligen Fälle ohne Kenntnis des klinischen Outcomes, also verblindet erhoben. Anschließend wurde die Expression der Marker mit den bekannten klinischen Variablen korreliert. Hierzu wurden die Daten mittels Kreuztabellen und dem  $\chi^2$  Test nach Pearson untersucht. In den Fällen, in welchen die erwartete Häufigkeit weniger als 5 betrug, kam Fishers Exakter Test zur Anwendung. Da der Median des Alters bei Tumordiagnose im Kollektiv bei 70 Jahren lag, wurden die Patienten in zwei Gruppen ❶ "unter 70 Jahre" und ❷ "70 Jahre oder älter" eingeteilt. Es zeigte sich, dass signifikant mehr Tumoren ohne CD29 Färbung eine schlechtere Differenzierung aufwiesen ( $p = 0.037$ ). Ebenso zeigte sich für niedrige CD24 Scores (CD24 low) ein signifikanter Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad: schlecht differenzierte Tumoren zeigten weniger CD24 Expression ( $p = 0.026$ , Tab. 12).

	Anzahl Patienten	CD29+	CD29-	p	CD24+	CD24-	p	CD24high	CD24low	p
Alter in Jahren										
≥70	80 (51.3)	70 (44.9)	10 (6.4)		62 (39.7)	18 (11.5)		11 (7.1)	69 (44.2)	
<70	76 (48.7)	62 (39.7)	14 (9.0)	0.306	62 (39.7)	14 (9.0)	0.528	16 (10.3)	60 (38.5)	0.228
Geschlecht										
m	74 (47.4)	61 (39.1)	13 (8.3)		55 (35.3)	19 (12.2)		11 (7.1)	63 (40.4)	
w	82 (52.6)	71 (45.5)	11 (7.1)	0.473	69 (44.2)	13 (8.3)	0.129	16 (10.3)	66 (42.3)	0.444
Grading										
2	138 (88.5)	120 (76.9)	18 (11.5)		108 (69.2)	30 (19.2)		27 (17.3)	111 (71.2)	
3	18 (11.5)	12 (7.7)	6 (3.8)	<b>0.037</b>	16 (10.3)	2 (1.3)	0.370	0 (0.0)	18 (11.5)	<b>0.026</b>
CD24										
CD24+	124 (79.5)	105 (67.3)	19 (12.2)							
CD24-	32 (20.5)	19 (12.2)	5 (3.2)	1.000						
CD24high	27 (17.3)	26 (16.7)	1 (0.6)							
CD24low	129 (82.7)	106 (67.9)	23 (14.7)	0.079						

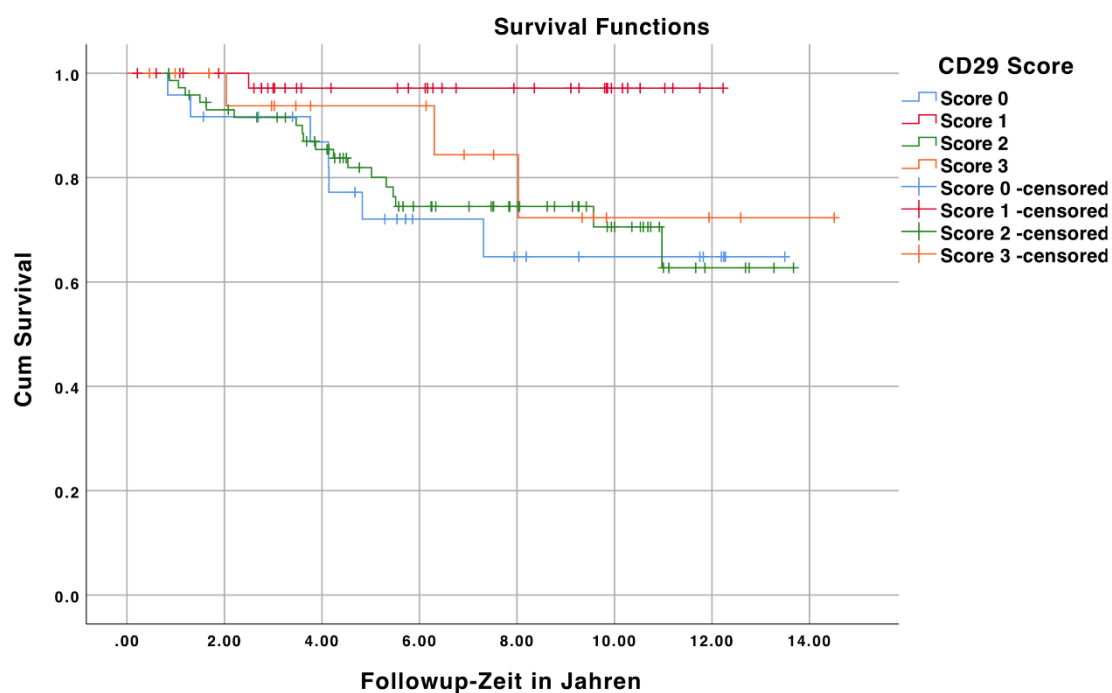
**Tab. 12:** Weder die Expression von CD29 noch von CD24 korrelierte mit Alter bzw. Geschlecht. Jedoch zeigte sich teilweise ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Tumoren und der Expression der beiden Marker.

#### 4.3.2.3. Das Expressionsmuster von CD29 und CD24 korreliert teilweise signifikant mit dem tumorspezifischen Überleben

Weiterhin wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Statistik das Überleben der Patienten univariat untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD29 und CD24 hinsichtlich des Tumor-spezifischen Überlebens besteht. Verstarb ein Patient innerhalb des Beobachtungszeitraumes Tumor-bedingt, wurde dies als Ereignis gewertet. Patienten, die bis zum Ende des Nachuntersuchungs-Zeitraumes (Follow-up) überlebten bzw. durch eine nicht Tumor-bedingte Ursache verstarben wurden zensiert. Bei der Auswertung wurde sowohl das generelle Auftreten bzw. Nicht-Auftreten eines immunhistochemischen Signals als auch der jeweilige Score des Markers sowie dessen zelluläre Lokalisation beachtet.

So zeigte sich bei der Analyse des Expressionsmusters von CD29 bezogen auf das Gesamtüberleben folgende Ergebnisse:

- ❶ Patienten, bei denen keine Expression von CD29 festgestellt werden konnte, überlebten kürzer als Patienten mit CD29 Expression ( $p = 0.224$ ).
- ❷ bei Betrachtung des CD29 Scores zeigte sich ein signifikant besseres Überleben von Patienten mit Score 1 ( $p = 0.49$ ), wohingegen Patienten mit Score 0 und 2 ein kürzeres Überleben aufwiesen als Patienten mit Score 3 (Abb. 15).
- ❸ Die Lokalisation der CD29 Expression an Zellstrukturen zeigte sich sehr heterogen. Es konnte keine Korrelation mit dem tumorspezifischen Überleben festgestellt werden ( $p = 0.201$ ). Bei keinem der Fälle, die sowohl an Membran als auch Kern und Plasma eine CD29 Färbung aufwiesen, trat ein Ereignis auf. Fälle mit rein membranöser Färbung zeigen ein besseres Überleben als Fälle mit membranöser- sowie zytoplasmatischer Färbung. Fälle, die keinerlei CD29 Färbung aufweisen, zeigen eine kürzere Überlebenszeit.
- ❹ Die CD29 Färbung von Tumordrüsen weist keinen Zusammenhang mit dem tumorspezifischen Überleben auf ( $p = 0.225$ ). Patienten, deren Tumoren generell keine CD29 Expression zeigten, überlebten am wenigsten lange. Bei Expression von CD29 an den Tumordrüsen kann initial ein schlechteres Überleben festgestellt werden als bei CD29 negativen Tumordrüsen.



#### Case Processing Summary

CD29 Score	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
Score 0	24	7	17	70.8%
Score 1	40	1	39	97.5%
Score 2	73	18	55	75.3%
Score 3	19	3	16	84.2%
Overall	156	29	127	81.4%

#### Means and Medians for Survival Time

CD29 Score	Mean <sup>a</sup>				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
Score 0	10.195	1.030	8.175	12.214	.	.	.	.
Score 1	11.949	.274	11.412	12.486	.	.	.	.
Score 2	10.702	.594	9.538	11.865	.	.	.	.
Score 3	12.178	1.171	9.883	14.472	.	.	.	.
Overall	11.937	.421	11.111	12.762	.	.	.	.

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

#### Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7.862	3	.049

Test of equality of survival distributions for the different levels of CD29 Score.

**Abb. 15:** signifikant besseres Überleben der Patienten mit CD29 Score 1

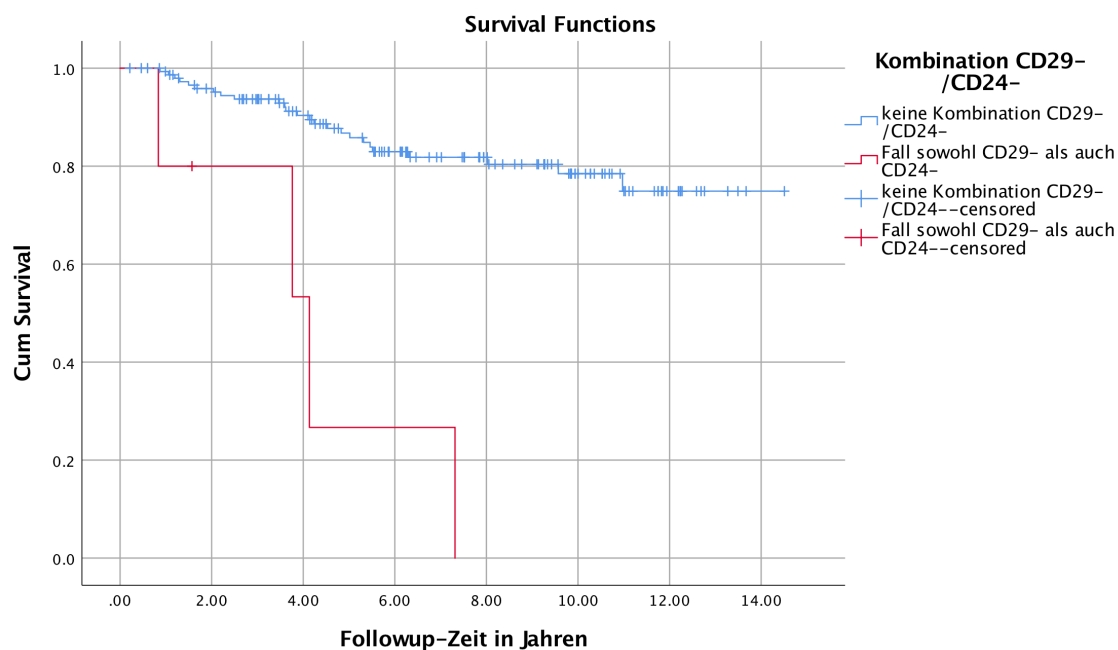


Die Auswertung des Expressionsmusters von CD24 bezogen auf das Gesamtüberleben zeigte:

- ❶ Patienten, bei denen keine CD24 Expression auftrat, überlebten kürzer als Patienten mit CD24 Expression ( $p = 0.279$ ).
- ❷ Bei der Analyse des CD24 Scores zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge ( $p = 0.281$ ). Generell überlebten Patienten des Scores 0 am wenigsten lange. Patienten mit Score 3 zeigten ein besseres Überleben als Patienten mit Score 1 und 2.
- ❸ Bei der weiteren Unterteilung des CD24 Scores in CD24<sup>high</sup> (Score 3) und CD24<sup>low</sup> (Score 0, 1 und 2) zeigte sich folglich ebenso ein besseres Überleben von Patienten mit hoher CD24 Expression, wohingegen Patienten mit geringer CD24 Expression eine kürzere Überlebenszeit aufwiesen. Die Differenz war jedoch nicht signifikant ( $p = 0.087$ ).
- ❹ Die intrazelluläre Verteilung von CD24 zeigte sich heterogener als bei CD29 und trat in sämtlichen möglichen Kombinationen auf. Bei keinem der Fälle, die ausschließlich nukleäre Färbung aufwiesen, trat ein Ereignis auf. Ebenso wurden alle Fälle zensiert, die eine Färbung sowohl an der Membran als auch im Zytoplasma zeigten. Eine Korrelation einer bestimmten Lokalisation mit dem tumorspezifischen Überleben konnte nicht festgestellt werden ( $p = 0.318$ ).
- ❺ Die CD24 Färbung von Tumordrüsen korrelierte nicht mit dem tumorspezifischen Überleben ( $p = 0.511$ ). Tumore, die CD24 Färbung aufwiesen, allerdings nicht an den Tumordrüsen gefärbt waren, führten zu einem besseren Überleben als Tumore, bei denen die Tumordrüsen ein CD24 Signal aufwiesen. Das Überleben von Patienten ohne jegliche CD24 Färbung stellte sich am schlechtesten dar.

Die Analyse der kombinierten Expression von CD29 und CD24 in Bezug auf das Gesamtüberleben zeigt folgende Ergebnisse:

- ❶ Fälle, die Expression von sowohl CD29 als auch CD24 aufwiesen, zeigten ein leicht besseres Überleben als Fälle, die diese Kombination nicht aufwiesen ( $p = 0.665$ ).
- ❷ Bei vier von insgesamt fünf Fällen, die weder CD29 noch CD24 Expression aufwiesen, also sowohl CD29 Score 0 als auch CD24 Score 0 darstellten, trat tumorbedingt der Tod ein. Dies geschah signifikant früher als bei tumorbedingt verstorbenen Patienten, die diese Kombination nicht aufwiesen ( $p = 0.000$ , Abb. 16).

**Case Processing Summary**

Kombination CD29-/CD24-	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
keine Kombination CD29-/CD24-	151	25	126	83.4%
Fall sowohl CD29- als auch CD24-	5	4	1	20.0%
Overall	156	29	127	81.4%

**Means and Medians for Survival Time**

Kombination CD29-/CD24-	Mean <sup>a</sup>				Median			
	95% Confidence Interval				95% Confidence Interval			
	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
keine Kombination CD29-/CD24-	12.211	.412	11.404	13.018	.	.	.	.
Fall sowohl CD29- als auch CD24-	4.223	1.220	1.832	6.615	4.134	1.396	1.398	6.871
Overall	11.937	.421	11.111	12.762	.	.	.	.

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

**Overall Comparisons**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	24.358	1	.000

Test of equality of survival distributions for the different levels of Kombination CD29-/CD24-.

**Abb. 16:** CD29- als auch CD24- Fälle zeigten ein signifikant kürzeres tumorspezifisches Überleben.

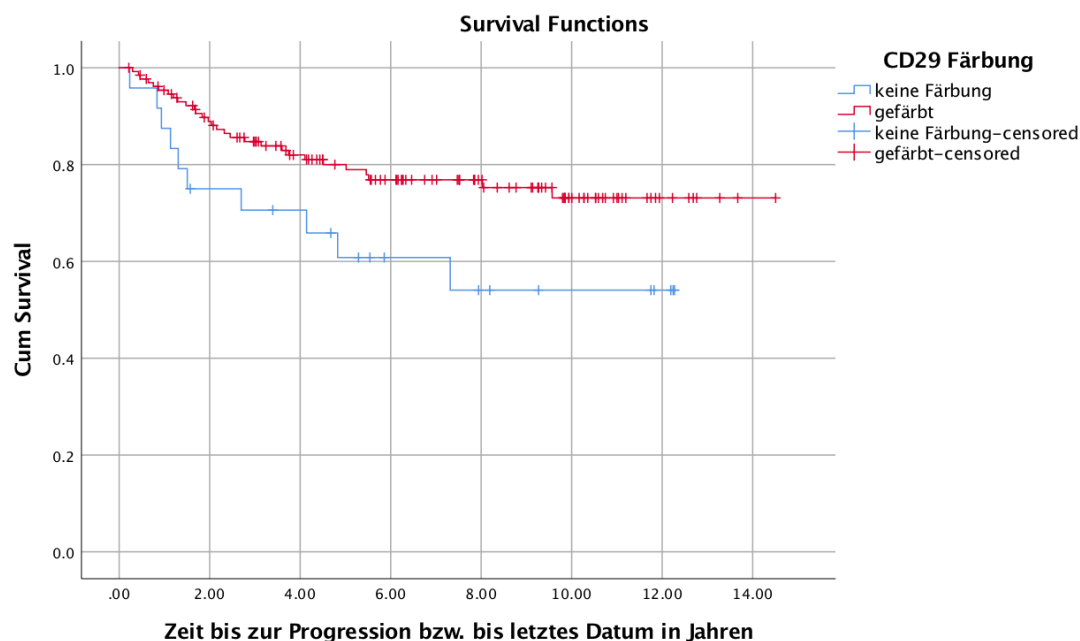
#### 4.3.2.4. Das Expressionsmuster von CD29 und CD24 korreliert teilweise signifikant mit der Progression kolorektaler Tumoren

Anschließend wurde das Expressionsmuster der beiden Marker in Hinblick auf Progression untersucht. Dies geschah ebenfalls mit Hilfe der Kaplan-Meier Statistik. Trat innerhalb des Beobachtungszeitraumes eine Progression in Form eines Tumorrezidivs oder Metastase auf, wurde dies als Ereignis gewertet. Analog zur Überlebensanalyse wurde das Auftreten von Progressionen sowohl in Abhängigkeit eines generellen Auftretens bzw. Nicht-Auftretens eines immunhistochemischen Signals sowie des jeweiligen Scores des Markers als auch unter Berücksichtigung der zellulären Lokalisation der Färbung analysiert.

Die Analyse des Expressionsmusters von CD29 bezogen auf Progressionen ergab folgende Ergebnisse:

- ❶ Bei Fällen, die keine Expression von CD29 aufwiesen, kam es signifikant früher zu einer Progression als bei Fällen, die CD29 exprimierten ( $p = 0.042$ , Abb. 17).
- ❷ Fälle mit CD29 Score 0 wiesen deutlich früher Progressionen auf als Fälle mit Score 2 und 3, wohingegen Fälle mit Score 1 eine günstigere Progressionsrate zeigten ( $p = 0.094$ ).
- ❸ Bei keinem der Fälle, die an Membran, Kern und Plasma gefärbt waren, trat eine Progression auf, weswegen alle Fälle zensiert wurden. Fälle, die keinerlei Färbung aufwiesen zeigten eine schnellere Progression als Fälle, die an Membran und Plasma gefärbt waren. Fälle, die lediglich an der Membran CD29 exprimierten wiesen die günstigste Progressionsrate auf. Es konnte keine Korrelation zwischen Lokalisation der Färbung und Progression nachgewiesen werden ( $p = 0.109$ ).
- ❹ Ebenso wenig zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression von CD29 an Tumordrüsen und der Progression ( $p = 0.076$ ). Fälle, deren Tumordrüsen CD29 positiv waren, führten schneller zu Progressionen als Fälle ohne CD29 Expression an den Tumordrüsen. Am schnellsten kam es bei denjenigen Fällen zu Progressionen, die sich gänzlich CD29 negativ darstellten.





#### Case Processing Summary

CD29 Färbung	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
keine Färbung	24	10	14	58.3%
gefärbt	132	29	103	78.0%
Overall	156	39	117	75.0%

#### Means and Medians for Survival Time

CD29 Färbung	Mean <sup>a</sup>				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
keine Färbung	7.936	1.051	5.875	9.996	.	.	.	.
gefärbt	11.513	.485	10.562	12.464	.	.	.	.
Overall	11.127	.463	10.219	12.035	.	.	.	.

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

#### Overall Comparisons

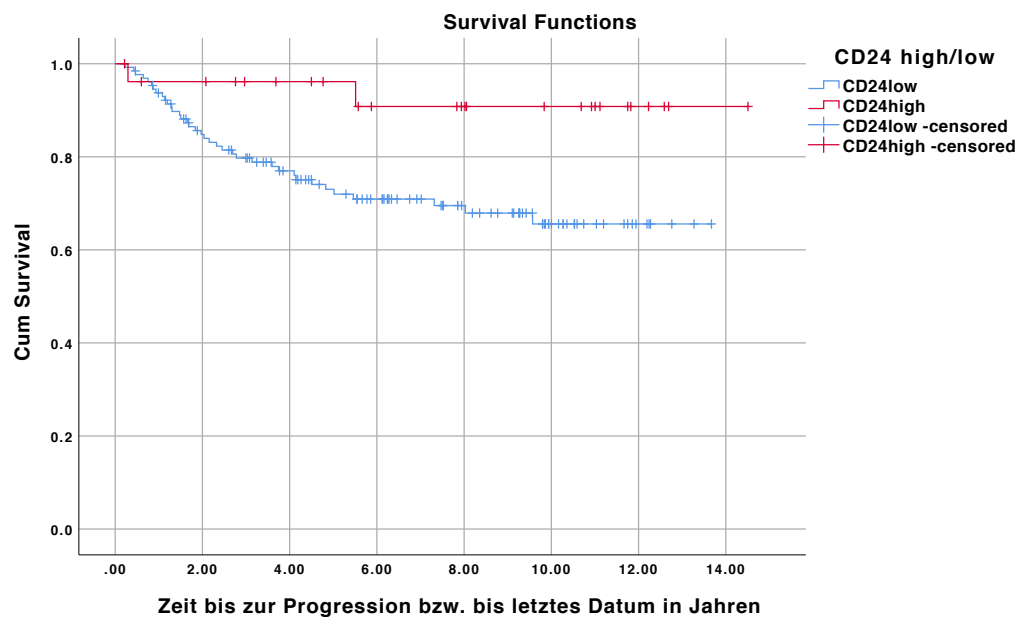
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4.117	1	.042

Test of equality of survival distributions for the different levels of CD29 Färbung.

**Abb. 17:** signifikant früherer Eintritt einer Progression bei Fällen, die keine Expression von CD29 aufwiesen

Bei der Untersuchung des Expressionsmusters von CD24 bezogen auf Progressionen konnten folgende Resultate festgestellt werden:

- ❶ Fälle, die keine CD24 Expression zeigten, wiesen früher eintretende Progressionen auf als Fälle mit CD24 Expression ( $p = 0.313$ ).
- ❷ Fälle, die mit CD24 Score 0 bewertet wurden, wiesen initial früher eintretende Progressionen auf. Fälle des Scores 1 und 2 zeigten eine ähnliche Progressionsrate, wobei Fälle des Scores 3 am seltensten Progression zeigten ( $p = 0.164$ ).
- ❸ Die weitere Unterteilung in CD24<sup>high</sup> bzw. CD24<sup>low</sup> ließ ein signifikant früheres Auftreten von Progressionen bei CD24<sup>low</sup>-Fällen deutlich werden ( $p = 0.029$ , Abb. 18).
- ❹ Das heterogene Expressionsmuster von CD24 an den Zellstrukturen ließ keinen Zusammenhang zwischen Lokalisation der Färbung und Progressionen erkennen ( $p = 0.302$ ). Bei keinem der Fälle, die ausschließlich nukleäre Expression zeigten, trat eine Progression auf, weswegen alle Fälle zensiert wurden. Am frühesten traten Progressionen bei Fällen auf, die keinerlei CD24 Expression zeigten, gefolgt von Fällen, die CD24 an nukleär und membranös exprimierten.
- ❺ Fälle, deren Tumordrüsen CD24 negativ bewertet wurden, wiesen am seltensten Progressionen auf, wohingegen Fälle mit CD24 Färbung der Tumordrüsen frühe Progressionen zeigten. Am frühesten traten Progressionen bei Fällen auf, die keinerlei CD24 Expression zeigten ( $p = 0.476$ ).



#### Case Processing Summary

CD24 high/low	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
CD24 low	129	37	92	71.3%
CD24 high	27	2	25	92.6%
Overall	156	39	117	75.0%

#### Means and Medians for Survival Time

CD24 high/low	Mean <sup>a</sup>				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
CD24low	10.094	.490	9.133	11.056	.	.	.	.
CD24high	13.480	.697	12.114	14.845	.	.	.	.
Overall	11.127	.463	10.219	12.035	.	.	.	.

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

#### Overall Comparisons

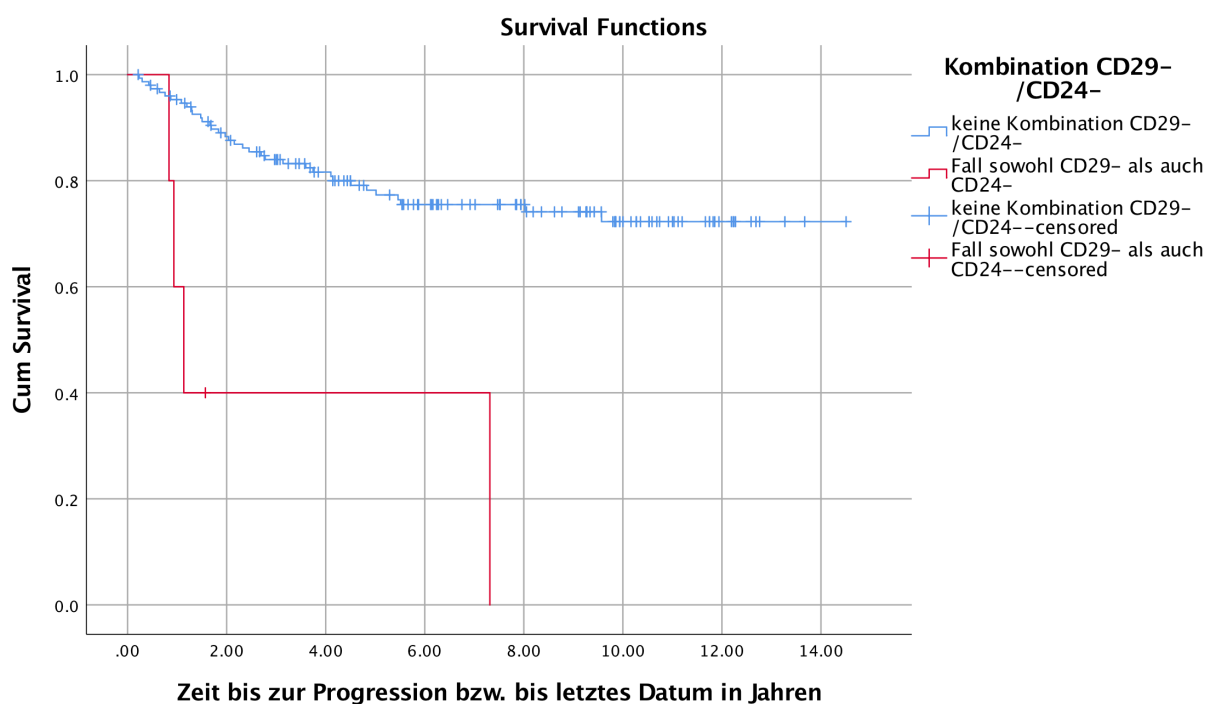
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4.783	1	.029

Test of equality of survival distributions for the different levels of CD24 high/low.

**Abb. 18:** signifikant früheres Auftreten von Progressionen bei CD24low-Fällen

Anschließend wurde untersucht, ob eine kombinierte Expression von CD29 und CD24 einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Progressionen erkennen lässt. Hierbei konnte folgendes festgestellt werden:

- ❶ Fälle, die sowohl CD29 als auch CD24 Expression aufwiesen, zeigten spätere Progressionen als Fälle, die diese Kombination nicht aufwiesen ( $p = 0.234$ ).
- ❷ Wie bereits bei der Überlebensanalyse beobachtet, konnte auch bei Beurteilung der Progression eine signifikant früher eintretende Progression bei Fällen, die sowohl CD29 als auch CD24 negativ waren, festgestellt werden ( $p = 0.000$ , Abb. 19). Bei vier von insgesamt fünf Fällen, die diese Marker-Kombination aufwiesen, kam es zur Progression. Bei Patienten, die diese Marker-Kombination nicht aufwiesen, traten Progressionen erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt auf.

**Case Processing Summary**

Kombination CD29-/CD24-	Total N	N of Events	Censored	
			N	Percent
keine Kombination CD29-/CD24-	151	35	116	76.8%
Fall sowohl CD29- als auch CD24-	5	4	1	20.0%
Overall	156	39	117	75.0%

**Means and Medians for Survival Time**

Kombination CD29-/CD24-	Mean <sup>a</sup>				Median			
	95% Confidence Interval				95% Confidence Interval			
	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound
keine Kombination CD29-/CD24-	11.383	.458	10.486	12.281	.	.	.	.
Fall sowohl CD29- als auch CD24-	3.507	1.606	.358	6.656	1.134	.219	.705	1.564
Overall	11.127	.463	10.219	12.035	.	.	.	.

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

**Overall Comparisons**

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	19.526	1	.000

Test of equality of survival distributions for the different levels of Kombination CD29-/CD24-.

**Abb. 19:** Fälle, die weder CD29 noch CD24 Färbung aufwiesen, zeigten eine signifikant frühere Tumor-Progression.

		tumorspezifisches Überleben		mittlere Überlebenszeit	p	Progression		mittlere Zeit bis Progression	p
		+	-			+	-		
CD29 Färbung	positiv	22	17	12.133	0.224	29	103	11.513	<b>0.042</b>
	negativ	7	110	10.195		10	14	7.936	
CD29 Score		0	7	17	<b>0.049</b>	10	14	7.936	0.094
		1	1	39		5	35	10.800	
		2	18	55		20	53	10.332	
		3	3	16		4	15	11.408	
CD29 Lokalisation an Zellstrukturen	Membran	11	66		0.201	16	61		0.109
	Membran + Kern + Plasma	0	4			0	4		
	Membran + Plasma	11	40			13	38		
	keine Färbung da Score 0	7	17			10	14		
CD29 Färbung an Tumordrüsen	positiv	16	66	11.787	0.225	20	62	11.139	0.076
	negativ	6	44	11.422		9	41	10.763	
	keine Färbung da Score 0	7	17	10.195		10	14	7.936	
CD24 Färbung	positiv	22	102	12.119	0.279	30	94	11.335	0.313
	negativ	7	25	9.923		9	23	9.322	
CD24 Score		0	7	25	0.281	9	23	9.322	0.164
		1	8	39		13	34	10.306	
		2	12	38		15	35	9.833	
		3	2	25		2	25	13.480	
CD24 high/low	high	2	25	13.512	0.087	2	25	13.480	<b>0.029</b>
	low	27	102	11.000		37	92	10.094	
CD24 Lokalisation an Zellstrukturen	Kern	0	3		0.318	0	3		0.302
	Membran	4	38			7	35		
	Membran + Kern	12	32			16	28		
	Membran + Kern + Plasma	5	16			5	16		
	Membran + Plasma	o	9			1	8		
	Plasma	1	4			1	4		
	keine Färbung da Score 0	7	25			9	23		
CD24 Färbung an Tumordrüsen	positiv	21	96	12.057	0.511	29	88	11.240	0.476
	negativ	1	6	12.311		1	6	12.311	
	keine Färbung da Score 0	7	25	9.923		9	23	9.322	
CD29+/CD24+ Kombination	Fall sowohl CD29+ als auch CD24+	19	86	11.994	0.665	24	81	11.481	0.234
	keine Kombination CD29+/CD24+	10	41	10.975		15	36	9.271	
CD29-/CD24- Kombination	Fall sowohl CD29- als auch CD24-	4	1	4.223	<b>0.000</b>	4	1	3.507	<b>0.000</b>
	keine Kombination CD29-/CD24-	25	126	12.211		35	116	11.383	

**Tab. 13:** Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analyse des untersuchten Kollektivs. Angabe der mittleren Überlebenszeit sowie der mittleren Zeit bis zum Auftreten einer Progression in Jahren.

## V. Diskussion

Dickdarmkrebs stellt eine der am besten erforschten Tumorerkrankungen des Menschen dar. Trotzdem beträgt die Stadien-unabhängige absolute 5-Jahres-Überlebensrate bei deutschen Männern und Frauen nur 52% und die absolute 10-Jahres-Überlebensrate lediglich 38 bzw. 40% [3]. Eines der wichtigsten Ziele in der Krebsforschung ist die Vervollständigung des Verständnisses von Tumorbildung und Tumorprogression. Das *Cancer Stem Cell* Modell bietet einen umfassenden und plausiblen Ansatz, Tumorigenese und deren Eigenschaften zu verstehen. So werden Tumoren und deren Metastasen von einigen wenigen Zellen, den Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSC) initiiert und aufrechterhalten. CSC sind resistent gegenüber Radio- und Chemotherapie [49, 50]. Es erscheint folglich logisch, dass diese schlechten langfristigen Überlebensprognosen maligner Tumoren nur dann verbessert werden können, wenn diese krebserzeugenden CSC mit geeigneten Therapiemaßnahmen angegriffen werden können. Dazu müssen diese CSC jedoch besser und genauer charakterisiert werden, was aufgrund der hohen Plastizität der Tumorzellen keine einfache Aufgabe ist. Weiterhin würde es die Identifikation kolorektaler CSC ermöglichen, Rückschlüsse auf die zu erwartende Prognose der Patienten zu ziehen und somit über die Notwendigkeit adjuvanter Therapiemaßnahmen zu entscheiden.

Da in bisherigen Untersuchungen keine eindeutige Zuordnung eines Markers für die Identifikation von CSC erreicht werden konnte, war es das Ziel dieser Arbeit, zu überprüfen, ob die als potentielle Tumorstammzell-Marker beschriebenen Moleküle CD29 und CD24 in kolorektalen Karzinomen immunhistochemisch ein Expressionsmuster zeigten, das auf deren Fähigkeit zur Markierung von Tumorstammzellen in situ schließen lässt.

Hierzu wurde eine retrospektive Auswahl von 156 Patientenfällen mit der Diagnose kolorektales Karzinom untersucht, die sich zwischen 1994 und 2005 an der Ludwig-Maximilians-Universität München einer vollständigen kurativen Tumoresektion unterzogen hatten. Von jedem Fall lagen Formalin-fixierte in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben des Primärtumors vor, wovon 2µm dicke Schnitte angefertigt wurden, die immunhistochemisch mit anti-CD29 und anti-CD24 spezifischen Antikörpern gefärbt wurden und anschließend mikroskopisch verblindet, d.h. ohne Kenntnis der klinischen Daten, ausgewertet wurden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine vermehrte Expression von CD29 und CD24 im Primärtumor zu einer kürzeren Tumor-spezifischen Überlebenszeit beziehungsweise zu einer schnelleren Progression im Sinne von Tumorrezidiven oder Metastasen führten sollte, wenn einer oder beide Marker CSC identifiziert.

Ähnliche in situ Untersuchungen wurden bereits für den Tumorstammzell-Marker CD133 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD133 an Tumordrüsen kolorektaler Karzinome mit einer signifikant schlechteren 5- und 10-Jahres-Überlebensrate einhergeht als bei Fällen, die keine CD133 Expression aufwiesen [39, 51]. Jedoch wurde ebenfalls festgestellt, dass die CD133 Expression nicht nur auf einige wenige Zellen beschränkt ist, sondern dass CD133 in einer Vielzahl von Tumorzellen, unabhängig von deren tumorbildenden Eigenschaften, nachweisbar ist [52]. Diese letzte Eigenschaft kollidierte mit der Erkenntnis, dass CSC in KRK eher in niedrigen Prozentbereich zu finden sind [33]. Die ebenfalls als potentielle CSC-Marker geltenden Oberflächenmarker CD166 und CD44 wiesen in bisher erfolgten immunhistochemischen Studien lediglich eine Tendenz zur Korrelation mit einem kürzeren Krebs-spezifischen Überleben bei Expression von CD166 auf [53, 54] beziehungsweise lieferten widersprüchliche Ergebnisse von einer signifikant kürzeren Überlebenszeit bei CD44 Expression [55] bis hin zu keiner Korrelation der Expression von CD44 mit dem Krebs-spezifischen Überleben [53].

Das Oberflächenprotein CD29 wurde im normalen Kolonepithel als Oberflächenmarker der proliferativen Zone von Kolonkrypten des Menschen identifiziert und scheint somit Stammzellen bzw. Progenitorzellen des Kolons zu markieren [56]. CD29 ist an der Regulation der Adhäsion von Zellen an der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt und kann die Progression kolorektaler Karzinome durch Invasion und Metastasierung vorantreiben [57]. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass humane Kolon-Stammzellen CD29 und CD24 stark exprimieren, weswegen beide Moleküle als mögliche Kolon-CSC Marker in Frage kommen [44]. Bei der immunhistochemischen Untersuchung von Mammakarzinomen auf Expression von CD29 wurde eine signifikant schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit starker CD29 Expression festgestellt als bei Patienten, die keine bzw. eine moderate CD29 Expression aufwiesen [58].

Eine Überexpression von CD24, die mit dem Tumorstadium bzw. einer schlechteren Prognose der Patienten korrelierte, konnte bereits in Adenokarzinomen der Pankreas, Prostatakarzinomen und Mammakarzinomen festgestellt werden [59-61]. Das Glykoprotein CD24 wurde erstmals als Oberflächenmarker von B-Lymphozyten identifiziert und ist ein Oberflächenmolekül, das sowohl in Zelladhäsionsvorgänge als auch in Prozesse bei der Metastasierung von Tumoren involviert ist [62]. Bisherige Untersuchungen zur immunhistochemischen Expression von CD24 in kolorektalen Karzinomen lieferten konträre Ergebnisse hinsichtlich einer Korrelation von Expression und Überleben [63, 64]. Somit stellten die beiden Marker CD29 und CD24 eine gerechtfertigte und Aufschluss versprechende Basis für die vorliegende Arbeit dar.



Die Prüfung auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD29 und klinischen Variablen ergab eine signifikante Korrelation zwischen fehlender Expression von CD29 und dem Differenzierungsgrad. Hier wiesen signifikant mehr schlecht differenzierte G3- im Vergleich zu mäßig differenzierten G2-Tumoren eine signifikant ( $p = 0,037$ ) geringere bis keine CD29 Färbung auf). Dies steht in Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass CD29 Zell-zu-Zell und Zell-zu-Kollagen Interaktionen zu vermitteln scheint, die für den Beginn und Erhalt der glandulären Differenzierung kolorektaler Tumorzellen benötigt werden [65] und dass CD29 in schlecht differenzierten kolorektalen sowie anderen malignen epithelialen Tumoren herunterreguliert ist [66, 67]. Ebenso konnte Su bei der immunhistochemischen Analyse verschiedener Karzinomarten, unter anderem auch kolorektaler Karzinome, im Vergleich zu deren gesundem Gewebe nachweisen, dass die Expression von CD29 innerhalb des tumorösen Gewebes geringer war als in nicht-tumorösen Gewebe, jedoch in gut differenzierten Karzinomen höher war als in schlecht differenzierten Karzinomen [68].

Gleichermaßen war ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD24 und dem Differenzierungsgrad der untersuchten Karzinome zu erkennen. So wiesen signifikant mehr schlecht differenzierte G3-Tumoren eine niedrige CD24 Expression (CD24<sup>low</sup>) auf, als mäßig differenzierte G2-Tumoren ( $p = 0.026$ ). Hierzu tauchen in der Literatur unterschiedliche Studienergebnisse auf. Choi konnte einen ähnlichen Zusammenhang zwischen negativer CD24 Expression und fortgeschrittenem Tumor-Differenzierungsgrad bei kolorektalen Adenokarzinomen feststellen [69]. Dem entgegen wies Weichert einen signifikanten Zusammenhang zwischen positiver zytoplasmatischer CD24 Immunreaktivität und einem höheren Tumorstadium nach [64].

Die hier durchgeführte Analyse der Überlebensdaten konnte keinen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von CD29 oder CD24 sowie deren kombinierter Expression mit dem Tumor-spezifischen Überleben bzw. der Zeit bis zu einer Progression aufzeigen. Zwar wiesen Patienten, deren Tumoren für CD29 mit Score 1 bewertet wurden, d.h. die an weniger als 50% der Tumorzellen CD29 Expression zeigten, ein knapp signifikant ( $p = 0.049$ ) besseres Tumor-spezifisches Überleben auf als Patienten, deren Tumoren mit dem CD29 Score 2 und 3 bewertet wurden, die also eine höhere CD29 Expression zeigten. Überraschenderweise zeigten jedoch Patienten, die mit dem Score 0 bewertet wurden, bei denen also keinerlei CD29 Expression feststellbar war, die kürzeste Tumor-spezifische Überlebensrate im Kollektiv. Diese Beobachtung setzte sich auch bei der generellen Expression von CD29 fort: Karzinome, deren Zellen keine CD29 Expression aufwiesen, führten schneller zum Tod als Karzinome, deren Zellen CD29 exprimierten. Bei Beurteilung der Färbung von CD29 an Tumordrüsen fiel auf, dass die Fälle mit Score 0 die kürzeste mittlere Überlebenszeit aufwiesen, wobei Fälle, die CD29 an den Tumordrüsen exprimierten, wiederum eine kürzere mittlere

Überlebenszeit zeigten als Fälle ohne CD29 Expression an den Tumordrüsen. Hinsichtlich der Progressionsrate zeigte sich ebenso, dass Tumoren, die keine CD29 Färbung aufwiesen, signifikant ( $p = 0.042$ ) schneller zu einer Progression in Form eines Rezidivs oder von Metastasen führten. Dazu passend wurde in einer kleineren Studie zur immunhistochemischen Untersuchung der Expression potentieller Kolon-CSC-Marker in Tumorgewebe von 30 Patienten festgestellt werden, dass eine verminderte CD29 Expression verbunden mit reduzierter EpCam und erhöhter ALDH1A1 Expression zu einer verminderten Überlebensrate führte [70]. Die schlechtere Prognose bei negativer CD29 Expression könnte damit erklärt werden, dass durch den Verlust der CD29 Expression und dessen Funktion als Zelladhäsionsmolekül den Tumorzellen der Weg zur Dedifferenzierung bereitet wird und diese ihre Kohäsionskraft verlieren, was wiederum Invasion und Metastasierung erleichtert [65]. Jedoch scheidet CD29 als Marker von CSC zumindest in dem untersuchten Kollektiv aus.

Die Analyse der CD24 Expression ergab in der vorliegenden Arbeit ein ähnliches Färbemuster und damit Ergebnis wie die CD29-Färbung. Generell zeigten Tumoren, die wenig oder kein CD24 exprimierten, eine schlechtere Tumor-spezifische Überlebensrate als Tumoren, mit immunhistochemisch nachweisbarer CD24 Expression. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen geringer CD24 Färbung (CD24low) und vermehrtem Auftreten von Progressionen in Form von Rezidiven oder Metastasen nachgewiesen werden ( $p = 0.29$ ). Demgegenüber stehen Forschungsergebnisse, die ein hohes zytoplasmatisches Expressionslevel von CD24 in kolorektalen Karzinomen ohne Fernmetastasen mit einer signifikant reduzierten Überlebenszeit nachwiesen [64]. Choi schloss nach der Untersuchung von 307 Gewebeproben kolorektaler Karzinome, dass eine erhöhte zytoplasmatische und membranöse Expression von CD24 im Tumorgewebe im Verlauf der Tumor-Progression von einer prämaligen Tumorphase hin zur Entwicklung eines Karzinoms ansteigt. Daher wurde CD24 als Marker der Tumor-Progression postuliert [71]. Andere Studien wiederum stehen stark im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. So stellte Ahmed bei der immunhistochemischen Analyse von 345 kolorektalen Karzinomen nicht nur membranöse und zytoplasmatische Lokalisierung der Färbung fest, sondern auch nukleäre Expression von CD24. Weiterhin zeigte die statistische Analyse des Expressionsmusters keinerlei Korrelation zwischen CD24 Expression und schlechter Prognose, sondern ließ gegenteilig darauf schließen, dass der Verlust von CD24 Expression vermehrt mit einem schlechten klinischen Outcome einhergeht [63]. Eine ähnliche Aussage konnte auch in Bezug auf Tumorzellen des Mammakarzinoms getroffen werden. Die Abwesenheit von CD24 Expression war in invasiven Zelllinien signifikant häufiger festzustellen als in nicht-invasiven Zelllinien [72].

Die kombinierte Expression der potentiellen CSC Marker CD29 und CD24 war bisher in kolorektalem Tumorgewebe noch nicht immunhistochemisch untersucht worden. Wie

die getrennte Analyse von CD29 und CD24 hinsichtlich des Überlebens und der Progression bereits angedeutet hatte, wiesen Fälle, die weder CD29 noch CD24 exprimierten eine höchst signifikant kürzere krebspezifische Überlebensrate sowie eine ebenso höchst signifikant schnellere Progressionsrate auf ( $p = 0.000$ ). Von insgesamt fünf CD29-/CD24- bewerteten Fällen innerhalb des untersuchten Kollektivs trat in vier Fällen eine Progression auf und 4 von 5 Patienten verstarben aufgrund der Tumorerkrankung. Da dieses Ergebnis lediglich auf fünf Fällen basiert, sollte die Untersuchung mit einem größeren Kollektiv validiert werden, um eine gesichere Aussage zu hierzu zu erhalten. Trotzdem kann das bei dieser Arbeit verwendete Kollektiv als repräsentativ betrachtet werden, da, wie eingangs beschrieben, die minimale Größe des Patientenkollektivs für die geplante Untersuchung mit Hilfe der Software G\*Power auf  $N=120$  bestimmt wurde und die minimal benötigte Anzahl an Fällen mit insgesamt 156 Patientenfällen sogar überschritten wurde. Somit lohnt es sich, die hier regenerierte Hypothese in einem zweiten unabhängigen Kollektiv zu validieren. In der Literatur bestehen zur Expression von CD24 und CD29 konträre Ergebnisse [63, 70] [64, 71].

Die Verteilung des immunhistochemischen Signals von sowohl CD29 als auch CD24 stellte sich auf zellulärer Ebene heterogen dar. So wurde für CD29 eine Färbung sowohl ausschließlich membranöse als auch membranös-zytoplasmatische sowie ebenso membranöse, zytoplasmatische und nukleäre Färbungen beobachtet. Eine Korrelation der Lokalisation der Färbung mit klinischen Variablen oder dem Outcome der Patienten konnte nicht gezeigt werden. Für CD24 stellte sich die zelluläre Lokalisation der Immunreaktivität sogar noch heterogener dar und war in sämtlichen möglichen Kombinationen feststellbar. Es wurde wie bei CD29 keinerlei Korrelation der Lokalisation des immunhistochemischen Signals mit klinischen Variablen oder dem Outcome der Patienten gefunden. Eine sehr heterogene Verteilung der Färbung kann auf einen fehlerhaften Färbevorgang deuten. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da im restlichen an den Tumor grenzenden Gewebe kein vergleichbares Färbemuster feststellbar war, sodass eine Spezifität des Färbeergebnisses angenommen werden kann. Eine weitere Ursache für heterogenes Färbeverhalten können unspezifische Antikörperbindungen darstellen. Jedoch kann diese Fehlerquelle hier praktisch als ausgeschlossen angenommen werden, da die spezifische Bindung der Antikörper zuvor durch Western Blot und Färbung von FFPE-Zellen überprüft und bestätigt wurde. Auch wurde in anderen bisher durchgeführten Studien ähnliche Färbeverhalten festgestellt, wobei die nukleäre Expression von CD24 auf eine frühe Hochregulation von CD24 während der Tumorgenese zurückzuführen ist [63, 70]. Eine interessante Ergänzung würde hier die Verwendung von Serienschnitten oder Doppelfärbung des Tumorgewebes bieten, um den genauen Vergleich der zellulären Lokalisation von CD29 und CD24 innerhalb des gleichen Tumorareals ermöglichen.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass bis dato noch kein Konsens über universell anwendbare Methoden zur Identifizierung von Krebs-Stammzellen herrscht. Die meisten CSC Marker werden deshalb als Marker verwendet, weil sie entweder in normalen Stammzellen exprimiert sind oder weil sie bereits in malignen Tumoren anderer Gewebe als CSC Marker identifiziert werden konnten. So konnte CD29 als Marker intestinaler Stammzellen identifiziert werden [56] und CD24 unter anderem bereits in Pankreas-, Prostata- und Mammakarzinomen als prognostischer CSC Marker ausgewiesen werden [59, 60, 73]. Weiterhin wird vermutet, dass CD24<sup>high</sup>/CD29<sup>high</sup> die tumorinitiierende Zellfraktion in Kolonkarzinomen der Maus darstellen [44, 74]. Unter der Annahme, dass CD24 und CD29 Krebs-Stammzellen markieren, die die treibende Kraft bei der Tumorgenese, Progression und schließlich Metastasierung darstellen, müssten Patienten, deren Tumore eine vermehrte Expression von CD29 und CD24 aufweisen, eine kürzere krebsspezifische Überlebensrate bzw. eine kürzere Zeit bis zu einer Progression aufweisen als Patienten, deren Tumore diese Marker nicht exprimieren. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Im Gegenteil: Tumoren, die keinerlei CD29 und CD24 Expression zeigten, führten signifikant früher zum Tod bzw. zu einer Progression.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die schnellere Progression von CD29<sup>-</sup> Tumoren könnte sein, dass neoplastische Zellen zu einem Verlust von Integrinen tendieren, die ihre Adhäsion an der Basalmembran sichern, und im Gegenzug Integrine überexprimieren, die zu Zellüberleben, Proliferation und Migration während der Tumordinvasion führen. CD29 scheint hierbei in einigen Fällen die Tumورprogression zu unterdrücken [75].

Die Funktion von CD24 während der kolorektalen Tumorgenese ist noch nicht vollständig verstanden. Jedoch stellt Vermeulen bei der *in vitro* Analyse von tumorbildenden Kolon Sphäroid Kulturen fest, dass CD133<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Zellpopulationen CSC spezifisches klonogenisches Potential besitzen, aber dass nur 20% dieser CD133<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> Zellen innerhalb der Sphäroide tumorbildende Eigenschaften besaßen. Dies lässt darauf schließen, dass die restlichen Zellen die Fähigkeit zur Tumorbildung aufgrund von Differenzierung verloren haben, was die Gruppe durch eine auffallende Korrelation von klonogenischem Potential der untersuchten Subpopulationen und dem Zeitpunkt des differenzierungsbedingten Verlustes von die Subpopulationen definierenden Markern belegen konnte. So wird zum Beispiel sowohl CD133 als auch CD24 frühzeitig herabreguliert, wohingegen deren Koexpression am eindeutigsten klonogenisches Potential zeigte [44]. Dies könnte auf einen Zusammenhang mit der beobachteten schnelleren Progressionsrate von CD24<sup>low</sup> Tumoren in der vorliegenden Arbeit deuten. Trotzdem verdeutlichen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse im Kontext mit bisher durchgeführten Untersuchungen zur immunhistochemischen Expression von potentiellen CSC Markern, dass die Funktion der Marker noch nicht ausreichend

verstanden ist und der funktionale Effekt der Expression bis dato unbekannt ist. Fast immer werden CSC Marker aufgrund ihrer Fähigkeit zur Tumorbildung und ihres Expressionslevels in Xenograft-Modellen ausgewählt. Die meisten bisher identifizierten CSC Marker scheinen eine Rolle bei der Initiierung und/oder Aufrechterhaltung von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten innezuhaben. Hierbei muss kritisch festgehalten werden, dass eben diese Rolle bei der Zelladhäsion erklären könnte, warum die diese Marker exprimierenden Zellen besser im Stande sind, neue Zellformationen zu bilden [74]. Auch die beiden untersuchten Marker CD29 und CD24 spielen beide unter anderem bei der Zelladhäsion eine wichtige Rolle. Somit sollte der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen vermehrt auf die Funktion von CSC Markern gelegt werden, um diejenigen Marker zu identifizieren, die eine definierte Funktion in der hierarchischen Tumorgenese übernehmen. Ebenfalls ist zu überlegen, ob Studien zum Finden von CSC Surrogatmarkern über eine intensive Multifärbung durchgeführt werden sollten, um so über eine ROC (receiver operator curve)-Statistik das Optimum an Markern oder Markerkombinationen finden zu können, die dann in einem zweiten Kollektiv validiert werden müssten.

Zuverlässig identifizierbare CSC Marker sollten zu einem besseren Verständnis von Signalwegen und Regulationsmechanismen von Krebs-Stammzellen führen. Somit kann der Weg für Therapien bereitet werden, die die CSC direkt angreifen und dauerhaft eliminieren können. Auch kann bei Kenntnis der Funktion des CSC Markers beurteilt werden, ob die Zellen durch den Marker lediglich identifiziert werden oder ob die markierten Zellen auch eine Aussage zum Krankheitsverlauf geben. Dies ist von großem klinischem Interesse, da eine zuverlässige Aussage über die Prognose zu gezielteren Therapieentscheidungen führen wird. So könnten zum Beispiel Patienten mit kolorektalen Tumoren des Stadiums UICC II, bei denen durch einen zuverlässigen CSC Marker ein hohes Progressionsrisiko nachgewiesen werden kann, standardmäßig eine adjuvante Chemotherapie erhalten, die sie nach momentanen Therapieleitlinien nicht erhalten würde

## VI. Literaturverzeichnis

1. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2015. **65**(2): p. 87-108.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012*. European journal of cancer (Oxford, England : 1990), 2013. **49**(6).
3. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015.
4. Devkota, S., et al., *Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10-/- mice*. Nature, 2012. **487**(7405): p. 104-8.
5. Vazzana, N., et al., *Obesity-driven inflammation and colorectal cancer*. Curr Med Chem, 2012. **19**(34): p. 5837-53.
6. Stewart, B.W. and C.P. Wild, *World Cancer Report 2014*. 2014.
7. Stintzing, S.H., Volker; Jung, Andreas, Moosmann, Nicolas; Hiddemann, Wolfgang; Kirchner, Thomas, *Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit monoklonalen Antikörpern*. Dtsch Arztebl Int 2009, 2009. **106**(12): p. 202-6.
8. Merkel, S., et al., *High-risk groups of patients with stage II colon carcinoma*. Cancer, 2001. **92**(6): p. 1435-43.
9. O'Connell, J.B., M.A. Maggard, and C.Y. Ko, *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on cancer sixth edition staging*. Journal of the National Cancer Institute, 2004. **96**(19): p. 1420-1425.
10. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL*. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> (abgerufen am 20.01.2018).
11. Fodde, R., R. Smits, and H. Clevers, *APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(1): p. 55-67.
12. Muto, T., H.J. Bussey, and B.C. Morson, *The evolution of cancer of the colon and rectum*. Cancer, 1975. **36**(6): p. 2251-70.
13. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
14. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-170.
15. Jen, J., et al., *Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions*. Cancer Research, 1994. **54**(21): p. 5523-5526.
16. Vogelstein, B., et al., *Cancer Genome Landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-1558.
17. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
18. McDonald, S.A., et al., *Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(5): p. 267-74.
19. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-1787.
20. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.



21. Bienz, M. and H. Clevers, *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. Cell, 2000. **103**(2): p. 311-320.
22. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-1790.
23. Pinto, D. and H. Clevers, *Wnt, stem cells and cancer in the intestine*. Biol Cell, 2005. **97**(3): p. 185-96.
24. Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 349-354.
25. Fodde, R. and T. Brabletz, *Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior*. Current Opinion in Cell Biology, 2007. **19**(2): p. 150-158.
26. Brabletz, T., et al., *Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(9): p. 744-9.
27. Vermeulen, L., et al., *Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment*. Nature Cell Biology, 2010. **12**(5): p. 468-U121.
28. Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke, *Cancer stem cells: models and concepts*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 267-84.
29. BK, K. and H. Clevers, *Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5*. Gastroenterology, 2014. **147**(2): p. 289-302.
30. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-648.
31. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nature Medicine, 1997. **3**(7): p. 730-737.
32. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
33. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
34. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Mechanisms of disease - Cancer stem cells*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(12): p. 1253-1261.
35. Ailles, L.E. and I.L. Weissman, *Cancer stem cells in solid tumors*. Curr Opin Biotechnol, 2007. **18**(5): p. 460-6.
36. Brabletz, T., et al., *Invasion and metastasis in colorectal cancer: Epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 56-65.
37. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
38. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Research, 2005. **65**(23): p. 10946-10951.
39. Horst, D., et al., *CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2008. **99**(8): p. 1285-9.
40. Horst, D., et al., *The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer*. Journal of Pathology, 2009. **219**(4): p. 427-434.
41. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10158-63.
42. Du, L., et al., *CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6751-60.

43. Todaro, M., et al., *Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2151-62.
44. Vermeulen, L., et al., *Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13427-32.
45. Faul, F., et al., *G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences*. Behavior Research Methods, 2007. **39**(2): p. 175-191.
46. Ellmark, P., et al., *Multiplex detection of surface molecules on colorectal cancers*. Proteomics, 2006. **6**(6): p. 1791-1802.
47. Stupack, D.G., et al., *LYMPHOCYTE-B FIBRONECTIN RECEPTORS - EXPRESSION AND UTILIZATION*. Scandinavian Journal of Immunology, 1991. **34**(6): p. 761-769.
48. Santa Cruz Biotechnology, I. *Product Data Sheet CD24 (3H1143): sc 70-600*. Available from: <http://www.scbt.com/datasheet-70600-cd24-3h1143-antibody.html>.
49. Rich, J.N. and S. Bao, *Chemotherapy and cancer stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(4): p. 353-355.
50. Trumpp, A. and O.D. Wiestler, *Mechanisms of Disease: cancer stem cells - targeting the evil twin*. Nature Clinical Practice Oncology, 2008. **5**(6): p. 337-347.
51. Kojima, M., et al., *Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study*. Cancer Sci, 2008. **99**(8): p. 1578-83.
52. Shmelkov, S.V., et al., *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2111-20.
53. Horst, D., et al., *Prognostic Significance of the Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, and CD166 in Colorectal Cancer*. Cancer Investigation, 2009. **27**(8): p. 844-850.
54. Weichert, W., et al., *ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival*. Journal of Clinical Pathology, 2004. **57**(11): p. 1160-1164.
55. Huh, J.W., et al., *Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis*. Pathology International, 2009. **59**(4): p. 241-246.
56. Fujimoto, K., R.D. Beauchamp, and R.H. Whitehead, *Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression*. Gastroenterology. **123**(6): p. 1941-1948.
57. Fujita, S., et al., *ALTERATION OF EXPRESSION IN INTEGRIN BETA(1)-SUBUNIT CORRELATES WITH INVASION AND METASTASIS IN COLORECTAL-CANCER*. Cancer Letters, 1995. **91**(1): p. 145-149.
58. Yao, E.S., et al., *Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 659-64.
59. Jacob, J., et al., *Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades*. Pancreatology, 2004. **4**(5): p. 454-460.
60. Kristiansen, G., et al., *CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer*. Prostate, 2004. **58**(2): p. 183-192.



61. Kristiansen, G., et al., *CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4906-13.
62. Kristiansen, G., M. Sammar, and P. Altevogt, *Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule*. J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 255-62.
63. Ahmed, M.A., et al., *CD24 shows early upregulation and nuclear expression but is not a prognostic marker in colorectal cancer*. J Clin Pathol, 2009. **62**(12): p. 1117-22.
64. Weichert, W., et al., *Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6574-81.
65. Pignatelli, M., et al., *Morphoregulatory activities of E-cadherin and beta-1 integrins in colorectal tumour cells*. Br J Cancer, 1992. **66**(4): p. 629-34.
66. Pignatelli, M., M.E.F. Smith, and W.F. Bodmer, *LOW EXPRESSION OF COLLAGEN RECEPTORS IN MODERATE AND POORLY DIFFERENTIATED COLORECTAL ADENOCARCINOMAS*. British Journal of Cancer, 1990. **61**(4): p. 636-638.
67. Pignatelli, M., A.M. Hanby, and G.W.H. Stamp, *LOW EXPRESSION OF BETA-1, ALPHA-2 AND ALPHA-3 SUBUNITS OF VLA INTEGRINS IN MALIGNANT MAMMARY-TUMORS*. Journal of Pathology, 1991. **165**(1): p. 25-32.
68. Su, J.M., et al., *Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance*. World J Gastroenterol, 2002. **8**(4): p. 613-8.
69. Choi, D., et al., *Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(18): p. 2258-64.
70. Langan, R.C., et al., *A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers*. Journal of Cancer, 2012. **3**: p. 231-240.
71. Choi Yoon-La, Y.H.X., Sang-Jeon Lee, Seon Mee Park, Wun Jae Kim, Hee-Jin Kim, Seok-Hyung Kim, *Enhanced CD24 expression in colorectal cancer correlates with prognostic factors*. The Korean Journal of Pathology, 2006. **40**: p. 103-111.
72. Schindelmann, S., et al., *Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: Correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24*. Tumor Biology, 2002. **23**(3): p. 139-145.
73. Kristiansen, G., *Identifizierung differenziell exprimierter Gene in soliden Tumoren am Beispiel des Prostatakarzinoms und der Einsatz ausgewählter Gene (CD24, CD166) als molekulare Prognosemarker*, in Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin. 2003, Freie Universität Berlin: Berlin. p. 37.
74. Kemper, K., C. Grandela, and J.P. Medema, *Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells*. Oncotarget, 2010. **1**(6): p. 387-395.
75. Guo, W.J. and F.G. Giancotti, *Integrin signalling during tumour progression*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004. **5**(10): p. 816-826.

## VII. Abbildungsverzeichnis

<b>ABB. 1:</b> WELTWEITE VERTEILUNG NEUERKRANKUNGEN KOLOREKTALES KARZINOM .....	3
<b>ABB. 2:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ADENOM-KARZINOM-SEQUENZ NACH DEM MULTISTEP CARCINOGENESIS MODELL .....	7
<b>ABB. 3:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WNT/ $\beta$ -CATENIN SIGNALKASKADE .....	9
<b>ABB. 4:</b> ROLLE UND BEDEUTUNG DER CSC-ZELLEN FÜR CHEMORESISTENZ UND METASTASIERUNG.....	11
<b>ABB. 5:</b> BERECHNUNG DER MINIMALEN KOLLEKTIVGRÖÖE FÜR DIE UNTERSUCHUNG.....	16
<b>ABB. 6:</b> ANTI-CD29 UND ANTI-CD24 ANTİKÖRPER ERKENNEN IHRE ANTIGENE SPEZIFISCH. ....	26
<b>ABB. 7:</b> ERGEBNIS DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG DER ZELLINIEN MIT ANTI-CD29 .....	27
<b>ABB. 8:</b> ERGEBNIS DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG DER ZELLINIEN MIT ANTI-CD24 .....	28
<b>ABB. 9:</b> SCORING ZUR AUSWERTUNG DER CD29-FÄRBUNG. ....	30
<b>ABB. 10:</b> SCORING ZUR AUSWERTUNG DER CD24-FÄRBUNG .....	31
<b>ABB. 11:</b> BEISPIEL EINER CD29 POSITIVEN TUMORDRÜSE.....	32
<b>ABB. 12:</b> UNTERSCHIEDUNG DER EXPRESSION VON CD29 ZWISCHEN NUKLEÄRER, ZYTOPLASMATISCHER UND MEMBRANÖSER FÄRBUNG .....	32
<b>ABB. 13:</b> BEISPIEL FÜR CD24 POSITIV GEWERTETE TUMORDRÜSEN .....	33
<b>ABB. 14:</b> UNTERSCHIEDUNG DER EXPRESSION VON CD24 ZWISCHEN NUKLEÄRER, MEMBRANÖSER UND ZYTOPLASMATISCHER FÄRBUNG .....	33
<b>ABB. 15:</b> SIGNIFIKANT BESSERES ÜBERLEBEN DER PATIENTEN MIT CD29 SCORE 1 .....	36
<b>ABB. 16:</b> SIGNIFIKANT KÜRZERES TUMORSPEZIFISCHES ÜBERLEBEN BEI CD29-/CD24- .....	38
<b>ABB. 17:</b> SIGNIFIKANT FRÜHERER EINTRITT VON PROGRESSIONEN BEI CD24-.....	40
<b>ABB. 18:</b> SIGNIFIKANT FRÜHERER EINTRITT VON PROGRESSIONEN BEI CD24 <sup>LOW</sup> .....	42
<b>ABB. 19:</b> SIGNIFIKANT FRÜHERE PROGRESSION BEI CD29-/CD24-.....	44

## VIII. Tabellenverzeichnis

<b>TAB. 1:</b> TNM-KLASSIFIKATION DES KOLOREKTALEN KARZINOMS .....	4
<b>TAB. 2:</b> WESTERN BLOT: PUFFER UND LÖSUNGEN .....	18
<b>TAB. 3:</b> EINGESETZTE ZELLINIEN UND VOLUMINA DER EINGESETZTEN PROTEINLYSATE IN WESTERN BLOTS ....	18
<b>TAB. 4:</b> SPEZIFIKATION DER EINGESETZTEN ANTIKÖRPER .....	20
<b>TAB. 5:</b> ÜBERSICHT ÜBER DIE UNTERSCHIEDLICHEN VORGEHENSWEISEN FÜR DIE DETEKTION VON CD29 UND CD24 BZW. $\beta$ -ACTIN MITTELS WESTERN BLOT .....	21
<b>TAB. 6:</b> ÜBERSICHT VORGEHEN BEI IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNG .....	22
<b>TAB. 7:</b> ZUSAMMENSETZUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS .....	25
<b>TAB. 8:</b> EINGESETZTE ZELLINIEN UND DEREN ERGEBNISSE IN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG .....	27
<b>TAB. 9:</b> AUFSCHLÜSSELUNG DER SCORES.....	29
<b>TAB. 10:</b> VERTEILUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN EXPRESSION VON CD29 IM KOLLEKTIV .....	32
<b>TAB. 11:</b> VERTEILUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN EXPRESSION VON CD24 IM KOLLEKTIV .....	33
<b>TAB. 12:</b> ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM DIFFERENZIERUNGSGRAD DER TUMOREN UND DER EXPRESSION VON CD29 UND CD24.....	34
<b>TAB. 13:</b> ZUSAMMENFASSENDE ÜBERSICHT DER ERGEBNISSE DER KAPLAN-MEIER-ANALYSE DES UNTERSUCHTEN KOLLEKTIVS .....	45

## **IX. Anhang**

### **Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner als Direktor des pathologischen Instituts der LMU für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu können.

Von Herzen möchte ich Herrn Prof. Dr. Andreas Jung danken, der mir das Thema bereitstellte und mich immer und unermüdlich im Fortgang dieser Arbeit unterstützt hat und auf dessen wertvollen Rat ich auch nach Zeiten der längeren Abwesenheit zählen konnte. Danke!

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Achim Schäffauer, ohne dessen unermüdliche und geduldige Einarbeitung und Hilfestellung in sämtlichen Laborangelegenheiten diese Arbeit nicht zustande hätte kommen können.

Ein großes Dankeschön an Alexandra Schindler und Sabine Sagebiel-Kohler für die großartige Unterstützung im Labor!

Weiterhin danke ich Frau Dr. Lydia Kriegl für die Bereitstellung des Kollektivs und die wertvollen Tipps bei der mikroskopischen Auswertung der Schnitte. Hierfür gilt mein Dank ebenso Herrn Dr. Dr. Jens Neumann.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Jutta Engel, Leiterin des Tumorzentrums München, für die Bereitstellung der Patientendaten zu Beginn der Arbeit und Annegret Schäfer für die Austestung der optimalen Färbebedingungen für automatisierte immunhistochemische Färbungen mittels Ventana Benchmark XT Färbeautomaten.

Den größten Dank verdient meine Familie. Meine Eltern Erika und Dr. Gertlov Hartung, die mir bedingungslos und liebevoll den Weg zum Studium ermöglicht haben sowie mein Mann Maximilian, der mich immer unterstützt und ermutigt hat, die Arbeit abzuschließen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Winter, Eva Michaela

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Die Bedeutung der potentiellen Tumorstammzellmarker CD29 und CD24 für die Progression kolorektaler Karzinome**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen haben.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.07.2019

---

Ort, Datum

Eva Michaela Winter

---

Unterschrift